

JOEL ANTONIO BERNHARDT

INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DA ANASTOMOSE  
COLÔNICA EM RATOS TOXÊMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos  
Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka  
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA

2008

## DEDICATÓRIA

À Cláudia, minha esposa, pelo companheirismo, paciência, compreensão e ajuda que permitiram completar este trabalho.

À Paula e Thaís, minhas filhas, privadas de meu convívio muitas vezes, mas que também serviram de motivação para realizar este trabalho. Desejo que o exemplo da busca de aperfeiçoamento sirva para suas vidas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, orientador deste trabalho, por ter confiado que eu chegaria ao fim desta etapa de minha formação profissional, pela paciência e pela competente orientação em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, co-orientador, pelo grande auxílio e por ter repassado um pouco de sua grande experiência na pesquisa.

À Dra. Alessandra Borges Branco, sua capacidade, seu espírito de colaboração e abnegação são raros.

À Dra. Paula Suzin Trubian, pelo companheirismo, amizade, troca de informações e constante bom-humor.

Ao Dr. Bruno Schlemper, um mestre, por ter me apoiado e encaminhado a este programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Edson José Cardoso e Prof. Dr. Armando José D'Acampora por suas participações em diferentes momentos de minha formação profissional.

Ao Hospital Angelina Caron, onde realizamos estudos pilotos.

À funcionária do programa de pós-graduação em clínica cirúrgica Regina Sass Marques pela atenção e simpatia em todos os momentos.

Ao acadêmico Nicolas Galat Ahumada pelo auxílio nesta fase final.

Aos Prof. Péricles Henrique Zarske de Mello e Márcio Vieira Ângelo, ex e atual coordenador do curso de medicina da Univali, pela colaboração no ajuste das atividades para que esta pós-graduação se tornasse possível.

Aos ex-secretários municipais de saúde de Itajaí, Dr. Marco Giostri e Nausicaa Morastoni e à atual, Dra Rosalie Kupka Knoll, pelos constantes ajustes de horários no trabalho, sem os quais, seria impossível cursar as disciplinas.

Aos colegas de trabalho, Dr. Alcides de Souza e Dr. Carlos Antonio da Silva Couto pelo apoio e coberturas nas atividades de trabalho do hospital.

Aos meus pais, Wilmar e Dilma, em nome deles estendo a todos meus familiares que dividiram comigo todos os momentos de alegria, ansiedade e mau humor, compreendendo a importância desta fase de minha formação acadêmica e torcendo incondicionalmente para dar certo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DA FERIDA DURANTE A CICATRIZAÇÃO.....	22
FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DA MOLÉCULA DE COLÁGENO EM TRIPLA HÉLICE E REMODELAGEM DO COLÁGENO.....	26
FIGURA 3 – ELETROMICROGRAFIA DA E. COLI, DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E SUA LOCALIZAÇÃO NA PAREDE BACTERIANA.....	33
FIGURA 4 – MECANISMO DE AÇÃO DO LIPOPOLISSACARÍDEO NO DESENCADEAMENTO DA SEPSE.....	35
FIGURA 5 – DESENHO DO ESTUDO.....	40
FIGURA 6 – LIPOPOLISSACARÍDEO DE E. COLI E APLICAÇÃO INTRAPERITONEAL PARA INDUÇÃO DA TOXEMIA.....	40
FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DEMONSTRANDO A ANATOMIA (A), SECÇÃO DO CÓLON PROXIMAL (B), ANASTOMOSE PROXIMAL CONCLUÍDA (C) E ASPECTO FINAL APÓS ANASTOMOSE DISTAL (D).....	42
FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DA PEÇA CIRÚRGICA REMOVIDA PARA ESTUDO TENSIO MÉTRICO E SEGUNDA ANASTOMOSE APÓS ABERTURA DO CÓLON PARA ESTUDO HISTOLÓGICO.....	43
FIGURA 9 – DEMONSTRAÇÃO FOTOGRÁFICA DO ESTUDO TENSIO MÉTRICO DA ANASTOMOSE COLÔNICA.....	46
FIGURA 10 – ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO. IMAGEM DIGITALIZADA APÓS APLICATIVO IMAGE PRO-PLUS, VERSÃO 4.5 ®.....	48
FIGURA 11 – FOTOGRAFIA DO ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DEMONSTRANDO EM MARROM POSITIVIDADE PARA ANTIFATOR VIII (A) E MIOFIBROBLASTOS CORADOS UTILIZANDO ANTICORPO ANTI- $\alpha$ -ACTINA (B).....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – EVOLUÇÃO DA MÉDIA DOS PESOS DOS ANIMAIS DURANTE A PESQUISA.....	53
GRÁFICO 2 – VALORES DA ALBUMINA SÉRICA NO VIGÉSIMO-SEXTO DIA DA PESQUISA.....	56
GRÁFICO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO COLÁGENO MADURO E IMATURO ENTRE OS GRUPOS.....	59
GRÁFICO 4 – NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA.....	60
GRÁFICO 5 – NÚMERO DE VASOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA POR MUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTIFATOR VIII.....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉDIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS NO 21º DIA DO EXPERIMENTO.....	54
TABELA 2 – MÉDIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA CIRURGIA.....	54
TABELA 3 – MÉDIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DO SACRIFÍCIO .....	55
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DA ALBUMINA SÉRICA.....	55
TABELA 5 – AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA RESPOSTA À INDUÇÃO DA TOXEMIA PELO LPS.....	57
TABELA 6 – MÉDIAS DA VARIÁVEL FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO ENTRE OS GRUPOS.....	57
TABELA 7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO COLÁGENO MADURO ENTRE OS GRUPOS.....	58
TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO COLÁGENO IMATURO ENTRE OS GRUPOS.....	58
TABELA 9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO IMaC ENTRE GRUPOS GCN, GNT E GDT .....	59
TABELA 10– VALORES MÉDIOS DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA POR IMUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTICORPO ANTI- $\alpha$ -ACTINA MUSCULAR.....	60
TABELA 11– VALORES MÉDIOS DO NÚMERO DE VASOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA POR IMUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTIFATOR VIII.....	61

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAR OS ANIMAIS.....	45
QUADRO 2 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO COLÁGENO.....	47
QUADRO 3 - COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS AVALIADAS NOS GRUPOS GNT E GDT COM O GCN.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	- marca registrada
°C	- graus Celsius
±	- mais ou menos
μl	- microlitro
μm	- micrômetro
μg	- micrograma
%	- porcentagem
=	- igual
<	- menor
>	- maior
CD14	- conjunto de diferenciação <sup>14</sup>
cm	- centímetro
DP	- desvio padrão
EP	- erro padrão
et al	- e colaboradores
FMT	- força máxima de tração
FRT	- força de ruptura total
g	- grama
g/dL	- grama por decilitro
GCN	- grupo controle nutrido
GNT	- grupo nutrido toxêmico
GDT	- grupo desnutrido toxêmico
h	- hora
IL-1	- interleucina 1
IL-6	- interleucina 6
IL-8	- interleucina 8
IL-10	- interleucina 10
IL-13	- interleucina 13
IMaC	- índice de maturação do colágeno
kg	- quilograma
LBP	- proteína ligadora de LPS



LPC	- ligadura e perfuração cecal
LPS	- lipopolissacarídeo
mg	- miligrama
ml	- mililitro
mm	- milímetro
mmHg	- milímetros de mercúrio
MMP	- matriz metaloproteinase
mrn	- movimentos respiratórios por minuto
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro
n	- tamanho da amostra
nm	- nanômetro
NP	- nutrição parenteral
p	- nível de significância
PaCO <sub>2</sub>	- pressão parcial de gás carbônico
PCR	- proteína C reativa
pH	- potencial de hidrogênio
RGB	- sistema <i>red, green, blue</i>
RTMI	- resistência tênsil mínima
SF	- soro fisiológico
SRIS	- síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TGF- $\beta$	- fator transformador de crescimento beta
TF	- fator tecidual
TLR4	- receptores semelhantes ao Toll
TNF- $\alpha$	- fator de necrose tumoral alfa
VEGF	- fator endotelial vascular de crescimento

## Sumário

<b>RESUMO</b>	12
<b>ABSTRACT</b>	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 OBJETIVO	16
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	17
2.1 CICATRIZAÇÃO NO TRATO GASTROINTESTINAL	17
2.2 DESNUTRIÇÃO	27
2.3 SEPSE	30
2.3.1 Lipopolissacarídeo	32
2.3.2 Mecanismo de Ação do LPS	34
2.3.3 Tolerância ao LPS	35
2.4 SEPSE E CICATRIZAÇÃO ANASTOMOSE	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b>	38
3.1 MATERIAL	38
3.2 MÉTODO	38
3.2.1 Grupos de Estudo	38
3.2.2 Indução da Endotoxemia	39
3.2.3 Procedimento Cirúrgico	41
3.2.4 Punção Cardíaca	42
3.2.5 Pós-Operatório	43
3.2.6 Sacrifício dos Animais e Retirada das Peças	43
3.2.7 Dados Avaliados	44
3.2.7.1 Peso	44
3.2.7.2 Ingesta Alimentar Média	44
3.2.7.3 Estudo Tensiométrico	44
3.2.7.4 Avaliação Histológica	47
3.2.7.5 Imunoistoquímica	48
3.2.7.6 Avaliação Laboratorial	50
3.2.7.7 Análise Estatística	52
<b>4 RESULTADOS</b>	53
4.1 PESO	53
4.2 ALBUMINA SÉRICA	55
4.3 TOXEMIA	56
4.4 VARIÁVEIS DE FORÇA	57
4.5 DENSITOMETRIA DO COLÁGENO	58
4.6 IMUNOISTOQUÍMICA	60
<b>5 DISCUSSÃO</b>	63

5.1 MÉTODO .....	63
5.1.1 Animais.....	63
5.1.2 Desnutrição .....	64
5.1.3 Toxemia.....	65
5.1.4 Técnica .....	66
5.2 VARIÁVEIS ESTUDADAS .....	67
5.2.1 Estudo Tensiométrico.....	67
5.2.2 Avaliação da desnutrição .....	67
5.2.3 Avaliação da Toxemia .....	70
5.2.4 Estudo Tensiométrico.....	71
5.2.5 Avaliação Histológica .....	73
5.2.6 Avaliação Imunoistoquímica.....	75
5.2.6.1 Miofibroblastos .....	75
5.2.6.2 Número de Vasos.....	76
5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	77
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO I - INGESTA DIÁRIA DE RAÇÃO DO GRUPO CONTROLE E VALOR DO <i>PAIR FEEDING</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO II - PESOS DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO III - QUADRO GERAL DE RESULTADOS .....</b>	<b>96</b>

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DA ANASTOMOSE COLÔNICA EM RATOS TOXÊMICOS

A deiscência da anastomose continua sendo grande complicação na cirurgia do cólon. Vários fatores podem interferir no processo cicatricial, entre eles a desnutrição e a sepse. O efeito da associação destes fatores é desconhecido. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da desnutrição energética e protéica no processo de cicatrização da anastomose colônica em ratos submetidos à toxemia pelo lipopolissacarídeo (LPS), em relação aos parâmetros: estudo tensiométrico, deposição de colágeno e imunoistoquímica através da contagem de vasos e miofibroblastos. Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, peso médio de  $264,32g \pm 21,55g$ , distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo controle nutrido (GCN),  $n=15$ , e Grupo nutrido toxêmico (GNT),  $n=15$ , ambos com livre acesso à ração e água durante todo o experimento. Grupo desnutrido toxêmico (GDT),  $n=15$ , alimentados com 50% da média da ingesta do GCN durante todo o experimento (*pair feeding*). A partir do 22º dia os GNT e GDT foram submetidos à toxemia com LPS de *E. coli* 0111:B4 na dose de 1 mg/kg, por via intraperitoneal, em quatro doses consecutivas diárias. No 26º dia todos os animais foram anestesiados e submetidos a duas secções do cólon seguidas de anastomose termino-terminal, em plano único com oito pontos separados de nylon 6.0. Coletado sangue para avaliação laboratorial por punção intracardiaca. No quinto dia pós-operatório foram sacrificados. Uma anastomose foi utilizada para estudo tensiométrico e a outra conservada em formalina para estudo histológico (densitometria do colágeno) e imunoistoquímica para contagem de vasos e miofibroblastos. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para a análise paramétrica com o teste t de Student. O nível de significância adotado foi  $p<0,05$ . Os resultados mostraram diminuição do peso no GDT acompanhada de redução da albumina sérica ( $p=0,000$ ). Nos grupos submetidos à toxemia houve aumento da PCR, TNF- $\alpha$  e IL-6. O estudo tensiométrico mostrou diminuição da força máxima de tração no GDT ( $p<0,006$ ). Houve também diminuição do número de miofibroblastos ( $p=0,03$ ) e aumento do número de vasos sanguíneos ( $p=0,003$ ) no GDT. Não houve alteração na relação colágeno maduro e imaturo entre os grupos. Os dados permitem concluir que a desnutrição em ratos toxêmicos determina pior cicatrização da anastomose colônica, sem alteração na deposição de colágeno. Há diminuição do número de miofibroblastos e maior número de vasos na anastomose destes animais.

DESCRITORES: Desnutrição protéica. Desnutrição energética. Sepse. Cicatrização de feridas. Anastomose cirúrgica. Ratos. Endotoxemia.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF MALNUTRITION ON THE HEALING OF COLONIC ANASTOMOSIS IN TOXEMIC RATS.

Anastomotic dehiscence is still a great complication of colon surgery. Many factors such as malnutrition and sepsis can interfere in the healing process. The effect of these factors association is unknown. The objective of this study was to assess the influence of the protein-energy malnutrition on the process of healing of the colonic anastomosis in rats subjected to toxemia by lipopolysaccharide (LPS) according to the parameters: breaking strength, collagen deposition and immunochemistry by counting blood vessels and myofibroblasts. It was used 45 Wistar rats, males, average weight of  $264,32g \pm 21,55g$ , divided in three groups: the nourished group (GCN),  $n=15$  and nourished toxemic group (GTN),  $n=15$  both having free access to food and water for all the experiment. Toxemic undernourished group (GDT),  $n=15$  had only 50% of the average ingested by GCN during all the experiment (pair feeding). From the 22<sup>nd</sup> day the GNT and GDT were subjected to toxemia with LPS of *E. coli* 00111:B4 dose of 1mg/kg, intraperitoneally, four doses every day. On the 26<sup>th</sup> day all the animals were anesthetized and subjected to two colonic transection followed by end-to-end anastomosis, in a single layer with eight interrupted points of nylon 6.0. Blood samples were obtained from intracardiac puncture. On the 5<sup>th</sup> postoperative day they were sacrificed. An anastomosis was used for breaking strength and the other was conserved in formalin for histological study (collagen densitometry) and immunochemistry for blood vessels and myofibroblasts counting. In the nonparametric analysis was used the Mann-Whitney test and for the parametric analysis the t Student test. The level of significance adopted was  $p<0,05$ . The results showed a decrease of the weight of GDT followed by the reduction of serum albumin ( $p=0,000$ ). The groups subjected to toxemia had an increase of PCR, TNF- $\alpha$  and IL-6. The breaking strength study showed a decrease of the maximal tensile strength of the GDT ( $p<0.006$ ). There was also a decrease in the number of the myofibroblasts ( $p=0.03$ ) and an increase in the number of the blood vessels ( $p=0,0003$ ) in the GDT. There wasn't any alteration in the mature and immature collagen in the groups. The data allow us to conclude that the malnutrition in toxemic rats determined worse colon anastomotic healing, with no alteration in the mature collagen deposition. There was a decrease in the number of myofibroblasts and a higher number of blood vessels in the anastomosis in these animals.

**KEY WORDS:** Protein malnutrition. Energy malnutrition. Sepsis. Wound healing. Anastomosis, surgical. Rats. Endotoxemia

## 1 INTRODUÇÃO

A deiscência da anastomose do cólon continua um problema clínico grave que resulta em importante aumento da morbidade, da permanência hospitalar e da mortalidade.

As cirurgias do cólon são realizadas cada vez com maior frequência em situações complexas como após trauma, imunossupressão e no paciente idoso. Mesmo sob condições ideais podem ocorrer fístulas, variando de 0 a 30%, dependendo do grupo de pacientes estudado (MÄKELÄ; KIVINIEMI; LAITENEN, 2003; KONISH *et al.*, 2006).

O processo de cicatrização na anastomose do cólon segue essencialmente o mesmo padrão de todas as feridas. Inicia com a fase inflamatória na lesão, seguida pela fase proliferativa. Nesta, os principais eventos são epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição do colágeno. Na fase final ocorre a maturação, caracterizada pela contração da lesão, reorganização e remodelagem das fibras do colágeno recém-formado (THOMPSON; CHANG; JOBE, 2006; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A angiogênese se caracteriza pela formação de novos capilares a partir de vênulas e capilares preexistentes na área anastomótica. Este processo continua até a anastomose ser preenchida com uma matriz vascular, com fibroblastos e colágeno. Tem papel importante, pois a neovascularização garante adequada perfusão tecidual, pode representar um parâmetro preditivo da evolução da cicatrização e sua inibição prejudica a cicatrização da anastomose (SEIFERT *et al.*, 1997; te VELDE *et al.*, 2002; ENESTVEDT *et al.*, 2006).

O colágeno existente na submucosa é a proteína mais abundante e importante na cicatrização. Durante a fase proliferativa ocorre tanto lise quanto síntese do colágeno, predominando a síntese na cicatrização normal. A síntese do colágeno na anastomose é feita por fibroblastos e também por miofibroblastos (THOMPSON; CHANG; JOBE, 2006).

A resistência da anastomose não é dependente apenas da quantidade de colágeno sintetizado, mas também da qualidade, reorganização e remodelagem (RABAU *et al.*, 1995). A quantificação de fibras maduras e imaturas permite a avaliação qualitativa do colágeno. A avaliação histológica corada pelo *picrosirius red* e com digitalização de imagens determina a razão entre as porcentagens de

colágeno maduro (tipo I) e colágeno imaturo (tipo III) (COSTA *et al.*, 2003; LEMOS *et al.*, 2004; TRUBIAN, 2004).

Vários fatores locais como infecção e isquemia ou fatores sistêmicos como diabetes, desnutrição, anemia, hipotermia e trauma interferem na cicatrização. Outros fatores como preparo intestinal e técnica cirúrgica também influenciam na cicatrização. Devido a este processo multifatorial e a absoluta dificuldade de estudar o fenômeno da cicatrização por completo no contexto clínico, torna-se necessário desenvolver modelos animais, visando ao estudo da cicatrização normal e da patogênese da falência do processo cicatricial, aceitando suas limitações (BRASKEN; RENVALL; SANDBERG, 1991, KONISH *et al.*, 2006).

A sepse é a resposta inflamatória sistêmica secundária a infecção. A incidência de sepse continua a crescer. A mortalidade pode variar de 10% a 38% e o abdome é foco da infecção em 10% a 22% dos casos (BONE; GRODZIN; BALK, 1997; ANGUS *et al.*, 2001; VINCENT *et al.*, 2006).

A importância epidemiológica e as múltiplas faces da sepse implicam na necessidade de novos estudos para esclarecer sua fisiopatologia, novas estratégias terapêuticas ou testar novas modalidades diagnósticas. Entre os vários modelos desenvolvidos para o estudo da sepse, a endotoxemia pelo lipopolissacarídeo (LPS) é um dos mais utilizados em experimentos animais (FINK; HEARD, 1990).

A desnutrição pode atingir metade dos pacientes internados em hospitais (CORREIA; CAMPOS, 2003, WAITZBERG; CAIAFFA; CORREIA, 2001) e é reconhecida a relação inversa entre estado nutricional e potencial de cicatrização das feridas em animais experimentais (THORNTON; BARBUL, 1997).

Gonçalves (2005) demonstrou que a desnutrição causa diminuição da força tênsil da anastomose e da deposição de colágeno maduro no quinto dia de pós-operatório em ratos.

A associação de desnutrição, sepse e intervenções cirúrgicas são eventos clínicos freqüentes. A avaliação da cicatrização da anastomose colônica neste contexto não está estabelecida experimentalmente, bem como a utilização deste modelo para futuras intervenções terapêuticas também não foram estudados.

## OBJETIVO

Avaliar a influência da desnutrição energética e protéica no processo de cicatrização da anastomose colônica em ratos submetidos à toxemia pelo LPS, em relação aos parâmetros:

1. Estudo tensiométrico
2. Deposição do colágeno
3. Imunoistoquímico pela proliferação de miofibroblastos e vasos sanguíneos.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A cicatrização inadequada e a conseqüente fístula da anastomose colônica é uma importante causa de morbidade e mortalidade pós-operatória. Muitas destas anastomoses precisam ser realizadas em situações de urgência, na presença de infecção e em pacientes desnutridos.

### 2.1 CICATRIZAÇÃO NO TRATO GASTROINTESTINAL

O processo de cicatrização no trato gastrointestinal segue essencialmente o mesmo padrão de todas as feridas. Inicia-se com a resposta inflamatória na lesão, segue-se a síntese e deposição do colágeno e a maturação da ferida. Entretanto, existem variações entre os tecidos, que podem alterar a velocidade e o resultado final da cicatrização.

O trato gastrintestinal possui características peculiares que ocasionam diferenças no seu processo de cicatrização em relação aos demais órgãos. Há presença de múltiplas camadas em sua arquitetura histológica e a presença de camada serosa na proteção da linha de sutura. O meio ambiente para a cicatrização é bastante diferente pela presença do trânsito fecal, peristaltismo e pela flora bacteriana. O suprimento sangüíneo está mais sujeito a isquemia em situação de choque (MARTENS; HENDRIKS, 1991, THORNTON; BARBUL, 1997).

É importante ressaltar o papel da camada submucosa, que tem participação fundamental nas fases iniciais da cicatrização do trato gastrintestinal, pois é a camada que ancora as suturas cirúrgicas. Além disso, esta camada é composta por tecido conjuntivo frouxo, que contém a maioria dos componentes da matriz extracelular (THORNTON; BARBUL, 1997). É a principal responsável pela força tênsil do trato gastrintestinal, já observado em 1887 por Halsted (*apud HESP et al.*, 1984).

A observação direta dos eventos cicatriciais que envolvem o reparo de anastomoses colônicas exige que os dados sejam obtidos mediante estudos experimentais. Dessa forma, a maior parte das evidências relacionadas à cicatrização desse segmento avalia a integridade anastomótica a partir das alterações mecânicas e histológicas no cólon de animais.

A cicatrização inicia-se com a fase inflamatória ou fase *lag*. Ocorre resposta hemostática inicial com vasoconstricção seguida de aumento da permeabilidade vascular e migração de células inflamatórias para a ferida. Os neutrófilos são encontrados na anastomose 3 horas após a lesão, e atingem o máximo após 12 a 24 horas. Os monócitos e macrófagos teciduais surgem na anastomose entre dois e três dias após, sintetizam e liberam fatores de crescimento como fator de crescimento epidérmico, fator transformador do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento do queratinócito, que são importantes para a evolução do processo de cicatrização (HESP *et al.*, 1985; THOMPSON; CHANG; JOBE, 2006).

A presença do tecido de granulação na anastomose caracteriza o início da fase proliferativa, marcada pela lise e síntese do colágeno, migração de células epiteliais, aumento de fibroblastos, miofibroblastos e pela angiogênese (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990; THOMPSON; CHANG; JOBE, 2006; ENESTVEDT *et al.*, 2006).

Desde a primeira descrição dos miofibroblastos por Gabbiani; Ryan e Majne em 1971 muito têm sido descrito a respeito da sua origem e função.

Os miofibroblastos são fibroblastos semelhantes ao músculo liso que tem aparência e função semelhante independente do tecido que esteja. Suas funções são secreção de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias; fatores de crescimento; mediadores inflamatórios lipídicos e gasosos; e proteínas da matriz extracelular e proteases. Tem um papel importante na organogênese, oncogênese, inflamação, reparo e fibrose de muitos órgãos e tecidos. Várias citocinas e fatores de crescimento causam mobilidade, proliferação e diferenciação (POWELL *et al.*, 1999).

No processo cicatricial desempenha papel importante na contração da ferida, reduzindo a área de tecido lesado. Apresentam também participação importante na resposta inflamatória pela secreção de citocinas e quimiocinas e são capazes de aumentar ou diminuir a resposta inflamatória, através da secreção de mediadores da inflamação. Por último, a produção de moléculas da matriz extracelular como colágeno, glicosaminoglicans e fibronectina no espaço intersticial ou na membrana basal, como parte da sua função no crescimento, diferenciação e cicatrização das feridas (HINZ, 2007).

Os miofibroblastos intestinais são células  $\alpha$ -actina músculo liso positiva, que estão como um sincício com fibroblastos e células murais na lâmina própria do intestino. Tem papel importante na organogênese, nas doenças e no reparo

intestinal. Secretam colágeno tipo I e III e várias proteínas da matriz bem como matriz metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases, importantes no reparo e remodelação do tecido intestinal, revisado por Powell *et al.* (2005).

A transição dos fibroblastos para miofibroblastos é influenciada por fatores mecânicos, TGF-  $\beta$  e fibronectina. Ao final do processo cicatricial desaparecem por apoptose (DESMOULIÈRE; CHAPONNIER; GABBIANI, 2005).

A angiogênese, definida como o processo pelo qual novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir de outros pré-existentes, impacta de forma significativa em muitas situações como câncer, doença vascular isquêmica, inflamação e cicatrização. É o principal mecanismo de formação de vasos sanguíneos no adulto. Deve ser diferenciada da vasculogênese que se refere à formação *de novo* de vasos sanguíneos, a partir de células primitivas, que ocorre em fases iniciais do desenvolvimento do embrião (DVORAK, 2005).

Os eventos envolvidos na angiogênese iniciam por um estímulo sobre o revestimento das células endoteliais, desestabilizando e dissolvendo sua membrana basal por proteólise. Essa ruptura forma um brotamento capilar no tecido conjuntivo perivascular. O estímulo angiogênico desencadeado pelo fator endotelial vascular de crescimento (VEGF) aumenta a permeabilidade vascular, resulta na saída de proteínas plasmáticas como o fibrinogênio no espaço perivascular. Este fibrinogênio é convertido na forma de matriz protéica insolúvel pela ação proteolítica da trombina. Assim cria-se uma matriz para migração de novos brotamentos capilares, fibroblastos, macrófagos e outras células do tecido conjuntivo (NAGY *et al.*, 1989; BATTEGAY, 1995).

Os brotos capilares se alongam na direção do estímulo angiogênico como resultado da migração e proliferação das células endoteliais, formando um lúmen. Estes se anastomosam com outros brotos capilares, permitindo o fluxo sanguíneo. Novos brotamentos surgem a partir de capilares neoformados formando uma rede capilar. A estabilização e maturação vascular são obtidas pelo recrutamento de pericitos mediado pelo fator de crescimento derivado de plaquetas e pela reconstrução da membrana basal e regressão de vasos supranumerários (AUSPRUNK; FOLKMANN, 1977).

A regulação da angiogênese se dá pelo balanço de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, que mantém a estabilidade vascular. Em última instância, estes

fatores determinam se a célula endotelial permanece quiescente ou se adquire o fenótipo angiogênico (LAFLEUR; HANSLEY; EDWARDS, 2003).

Há evidências na literatura de que existem ligações entre o reconhecimento de patógenos e indução da resposta imune inata com fatores de crescimento que estão associados com estímulo à angiogênese (FRANTZ *et al.*, 2005). O LPS pode ativar brotamentos endoteliais diretamente através de sinalização pelos receptores TLR4, mesmo na ausência de citocinas (TAKEDA; AKIRA, 2004). Citocinas como fator de crescimento de fibroblastos e VEGF estimulam a proliferação. O VEGF é produzido por queratinócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, presentes na resposta à infecção e na cicatrização. Neutrófilos e macrófagos também estimulam a permeabilidade e a angiogênese através de TNF- $\alpha$  e IL-1 (CHEN *et al.*, 2004).

Outro estímulo importante à angiogênese é a hipóxia. A tensão de oxigênio é um regulador da produção de fatores de crescimento durante o reparo tecidual. A indução da angiogênese pelo VEGF foi demonstrada na cicatrização de feridas isquêmicas (CORRAL *et al.*, 1999).

A adequada evolução da cicatrização requer uma adequada angiogênese.

Seifert *et al.*, em 1997, avaliaram a angiogênese na anastomose, levando em conta a vascularização e a perfusão, em ratos. Utilizaram imunoistoquímica com anticorpo anti-colágeno tipo IV e um marcador fluorescente. Compararam o terceiro e o sétimo dias de pós-operatório no centro e na periferia da anastomose. Houve uma maior quantidade de vasos e uma melhor perfusão no sétimo dia em comparação com o terceiro, no tecido de granulação e na periferia da anastomose. Correlacionam esta evolução com o aumento da resistência da anastomose e ressaltam a importância da angiogênese para a adequada cicatrização da anastomose.

Te Velde *et al.*, em 2002, estudaram o efeito do angiostatin, uma droga antiangiogênica utilizada no tratamento de neoplasias, na anastomose de cólon de camundongos. Os animais que receberam angiostatin apresentaram maior número de fístulas, mais aderências e peritonite. A pressão de ruptura foi menor neste grupo associado a uma diminuição do número de vasos na anastomose.

Te Velde *et al.* (2003) novamente estudaram o efeito do angiostatin na anastomose de cólon de camundongos. Utilizaram imunoistoquímica com anti fator VIII. Encontraram diminuição do número de vasos no tecido de granulação

acompanhado de menor deposição de colágeno. Levantam a hipótese de que o angiostatin pode atuar através da diminuição na produção de células endoteliais ou por um aumento na destruição destas células.

Attard *et. al.* (2003) submeteram ratos à hipóxia e avaliaram a expressão do VEGF na anastomose no sétimo dia pós-operatório, confrontando com a avaliação mecânica da anastomose pela pressão de ruptura. Observaram piora nos parâmetros mecânicos acompanhado de aumento da expressão do VEGF. Concluíram que a piora da cicatrização a despeito do maior estímulo à angiogênese pode ser uma inabilidade do tecido responder ao estímulo do VEGF ou a hipóxia pode atuar diretamente, diminuindo a síntese e deposição de colágeno na anastomose.

A fase final da cicatrização envolve a maturação da anastomose. A densidade dos macrófagos e fibroblastos diminui. Ocorre contração da lesão, reorganização e remodelagem das fibras do colágeno recém-formado. Esta fase tem pouca importância clínica, pois a resistência da anastomose já atingiu valores suficientes na fase anterior (ELLISON, 1989) (FIGURA 1).

Durante os primeiros dias de pós-operatório, a resistência da anastomose é baixa, devido ao predomínio da lise sobre a síntese do colágeno por ação das collagenases. A integridade da anastomose é resultado da sutura sobre o colágeno preexistente, até que o novo colágeno seja sintetizado pelos miofibroblastos e fibroblastos.

Cronin, Jackson e Dunphy (1968) demonstraram pela primeira vez *in vivo*, que os níveis absolutos de colágeno em anastomoses colônicas de ratos reduziam-se até o terceiro dia após a cirurgia, ocorrendo aumento progressivo da sua quantidade até atingir valores quase normais em torno do décimo dia pós-operatório. Estas alterações se estendiam acima e abaixo da linha de sutura.

Hendriks *et. al.* (1985) relataram alteração nos níveis do colágeno entre 24 e 48 horas após anastomose. Atribuíram este achado à substancial lise de colágeno, demonstrada pela diminuição da concentração de hidroxiprolina no íleo e no cólon, onde esta concentração pode diminuir até 38%.

Jiborn, Ahonen e Zederfeldt (1978, 1980) mediante a utilização de hidroxiprolina radiomarcada, avaliaram o padrão de cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. Observaram que há intenso ciclo de síntese e degradação das

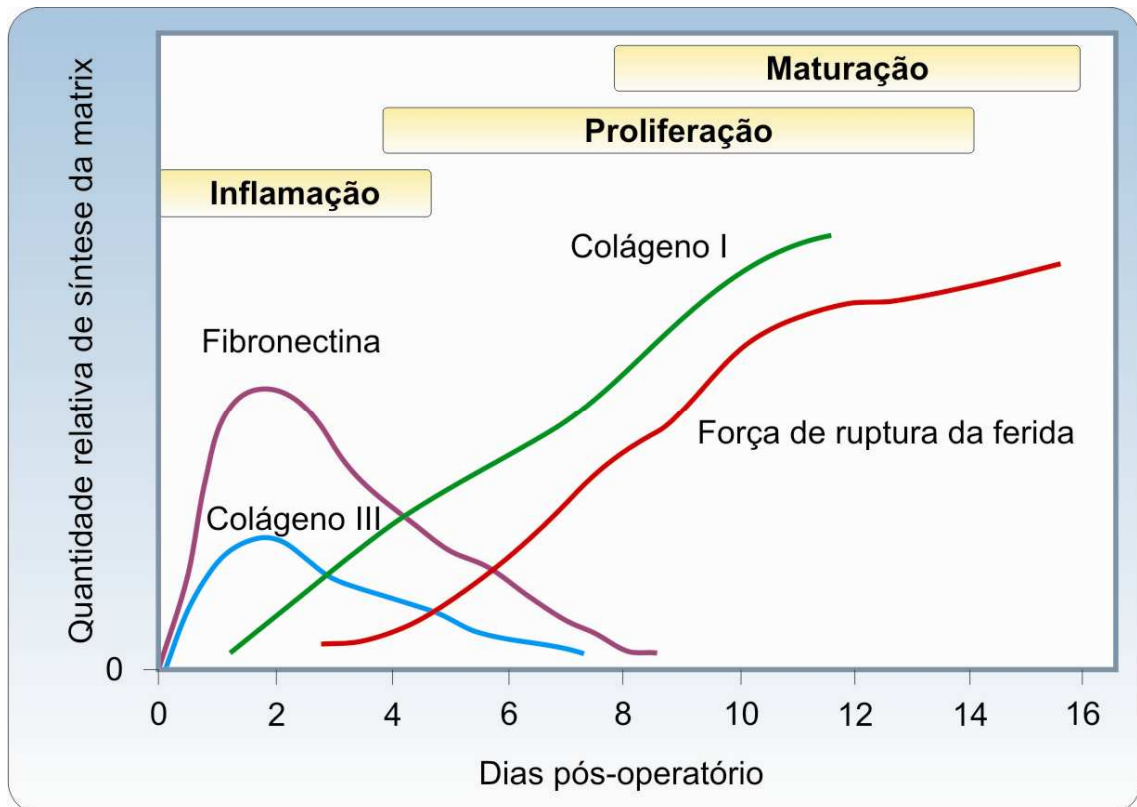


FIGURA 1 - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DA FERIDA DURANTE A CICATRIZAÇÃO  
 FONTE: ADAPTADO DE WITTE; BARBUL, 1997

fibras colágenas no início do processo de cicatrização da anastomose, com predomínio da degradação até o quarto dia de pós-operatório. Por volta do sétimo dia o processo de síntese sobrepuja o de degradação. Observaram também que este processo cíclico de síntese e degradação do colágeno ocorre não só na área da anastomose, mas também nos segmentos perianastomóticos, principalmente no segmento proximal.

Estudos *in vivo* para avaliar anastomoses de cólon e íleo de 3 horas a 28 dias demonstraram um aumento importante da produção de colágeno. No entanto, foi mais intensa e mais rápida no íleo do que no cólon, o que justifica maiores taxas de falhas nas anastomoses colônicas (MARTENS; HENDRIKS, 1991).

A degradação de colágeno é muito ativa durante o processo inflamatório e é realizada por collagenases específicas. Na linha de sutura, a collagenase é a enzima mais encontrada nas primeiras 24 horas, em especial na matriz extracelular da mucosa, que pode estar relacionado com seu papel de iniciador da lise do colágeno (SAVAGE *et al.*, 1997).

Na cicatrização de anastomoses intestinais também ocorre a degradação de colágeno maduro. Devido ao consumo do colágeno maduro existente na camada submucosa no período pós-operatório precoce, a força tênsil da anastomose depende das suturas ancoradas na camada submucosa, rica em colágeno. Colagenases intersticiais têm sido implicadas como possíveis fatores contribuintes para a diminuição precoce na força de ruptura das anastomoses gastrintestinais (JONSSON; HÖGSTRÖM, 1991; OXLUND *et al.*, 1996; MARTENS; HENDRIKS, 1991; MARTENS; HUYBEN; HENDRIKS, 1992).

No entanto, a colagenase é apenas um membro da família das enzimas da matriz metaloproteinase (MMP), que tem capacidade de atuar sobre todos os componentes da matriz extracelular. Duas outras classes de MMPs são *stromelysins* que degradam proteoglicans, fibronectina e laminina; além das gelatinases que degradam colágeno desnaturado e colágenos tipos IV e V (SEIFERT; WOBES; HENDRIKS, 1996; SAVAGE *et al.*, 1997).

As principais fontes de colagenase são os neutrófilos e fibroblastos. Além destes, bactérias da luz intestinal podem sintetizar (HESP *et al.*, 1985; IRVIN, 1976).

Outro parâmetro de avaliação da cicatrização da anastomose gastrointestinal é a utilização de métodos mecânicos.

Gray e Caldwell (1967) em extensa revisão histórica sobre equipamentos para estudo da força tênsil de objetos remonta a Leonardo da Vinci um dos primeiros aparelhos. Eles mesmos propõem um equipamento para avaliação da força de tração.

Herrmann, Woodward e Pulaski (1964) realizaram um estudo sobre a cicatrização de anastomose colônica de ratos. Dividiram uma amostra de 220 animais e mediram a força tênsil de anastomoses colônicas em diversos períodos de tempo compreendidos entre três horas e um ano após o procedimento cirúrgico. Evidenciaram que entre 3 e 14 dias havia o maior ganho de força tênsil da anastomose, constituindo-se assim no melhor período para estudar os parâmetros biofísicos da cicatrização do cólon anastomosado de ratos.

Jonsson, Jiborn e Zederfeldt (1983) associaram um componente eletrônico fornecendo maior sensibilidade ao sistema e adotaram o método de força de tração, no qual o aparelho tracionava o corpo de prova (anastomose centrada num segmento de intestino ressecado) a partir de uma das suas extremidades deixando a outra fixa até que ocorresse a ruptura da peça cirúrgica. Blomquist, Jiborn e

Zederfeldt (1984) estabeleceram a importância do aumento de força de forma contínua na avaliação dos resultados. Naresse *et al.* (1987) utilizaram o equipamento evidenciando que o mesmo apresentava erros mínimos de leitura, recomendando sua utilização em investigações experimentais de cicatrização intestinal e de outras feridas cirúrgicas.

Ikeuchi *et al.* (1999) desdobraram a variável força de ruptura em dois componentes: força mínima de tração (força necessária para romper parte da anastomose) e força máxima de tração (força necessária para realizar a disjunção total da anastomose). Nesse estudo, a força mínima de tração foi considerada medida padrão na avaliação biológica da cicatrização anastomótica, refletindo com maior acurácia as modificações mecânicas da mesma. Os autores testaram outro método de avaliação mecânica de anastomoses (pressão de ruptura) e verificaram a imprecisão dessa variável na avaliação de anastomoses em fases precoces da cicatrização, sem encontrar correlação da mesma com a força de ruptura. Os autores utilizaram variável denominada Resistência Tênsil Mínima (RTMI) em suas avaliações. A RTMI era caracterizada pela primeira queda transitória na curva do gráfico da tração (corresponde ao princípio de ruptura da anastomose). Segundo os autores, a RTMI seria a melhor variável para se avaliar a resistência das anastomoses. No estudo tensiométrico feito no presente estudo, a força máxima de tração (FMT) corresponde à variável RTMI usada por Ikeuchi *et al.* (1999). A alteração da nomenclatura teve como objetivo facilitar a interpretação dos dados, uma vez que esta variável significa a intensidade máxima de FMT que a anastomose íntegra pode suportar. A FMT é considerada a variável de maior importância avaliada.

Outros estudos também mostraram vantagens na avaliação da força tênsil utilizando a força de ruptura que, diferente da pressão de ruptura, correlaciona-se estreitamente com a deposição de colágeno a partir do quarto dia pós-operatório de anastomoses intestinais (JIBORN; AHONEN; ZENDERFELDT, 1978; BRASKEN; RENVALL; SANDBERG, 1991; VIZZOTO JUNIOR, 2001).

Nos últimos anos, os tensiômetros foram informatizados e a indústria disponibilizou vários modelos, facilitando o emprego dessa metodologia.

A síntese e deposição do colágeno são fenômenos fundamentais na cicatrização das anastomoses. O colágeno se encontra na camada submucosa



juntamente com vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas. O colágeno tipo I predomina (68%), seguido pelo tipo III (20%) e o tipo V (12%) (MAST, 1997).

A expressão de colágeno tipo I e III basal é encontrada na lâmina própria e submucosa do cólon íntegro. Após uma lesão, a expressão do gen do colágeno é fortemente ativada, com pico no terceiro dia para o colágeno I e segundo dia para o colágeno tipo III. A máxima expressão acontece no sétimo dia com ligeiro decréscimo durante as duas semanas subseqüentes. (BRASKEN; LEHTO; RENVALL, 1989). Na lâmina própria o colágeno tipo V e a laminina apresentam o mesmo padrão. Por outro lado, os menores níveis de colágeno tipo I ocorrem no segundo dia e do colágeno tipo III no primeiro dia. A expressão do colágeno tipo I pelo RNAm é muito maior e perdura mais tempo que o tipo III (BRASKEN; LEHTO; SANDBERG, 1991). Os autores concluem também que os locais de maior acúmulo do colágeno após anastomose colônica são: linha anastomótica, camada submucosa e superfície da serosa na área da anastomose.

Oxlund *et al.* em 1996, avaliaram as alterações temporais da deposição de colágeno nas anastomoses colônicas e em feridas incisionais cutâneas em ratos. A avaliação do metabolismo do colágeno foi realizada por meio da administração intravenosa de prolina marcada, estimando-se a deposição de colágeno por milímetro da linha de ferida. A quantidade de colágeno na anastomose foi estimada pela quantidade de hidroxiprolina. Os autores observaram aumento substancial na deposição de colágeno no segundo dia de pós-operatório, a qual alcançou o pico máximo no sexto dia, permanecendo relativamente alta até o 12º dia. A deposição de colágeno no cólon foi dez vezes superior à sua deposição nas feridas cutâneas incisionais.

A avaliação do efeito do hormônio do crescimento na anastomose colônica em ratos demonstrou deposição de fibrilas de colágeno no quarto dia, coincidindo com período de ganho de resistência (CHRISTENSEN *et al.*, 1995)

A resistência da anastomose não é dependente apenas da quantidade, mas também da qualidade do colágeno, da sua reorganização e remodelagem (FIGURA 2).

Rabau *et al.* (1995) realizaram estudo da concentração de colágeno em anastomoses intestinais de ratos utilizando coloração com *picrosirius red*. Verificaram que no intestino de ratos não operados havia predomínio de fibras colágenas de coloração que variava do amarelo ao laranja. Por outro lado, durante a

primeira semana pós-operatória a maioria das fibras no sítio anastomótico apresentavam-se finas, de colágeno imaturo com coloração que variava do verde ao amarelo e pouco integradas. Entretanto, as fibras gradualmente retornavam às suas colorações pré-operatórias até o 21º dia pós-operatório, acompanhando as

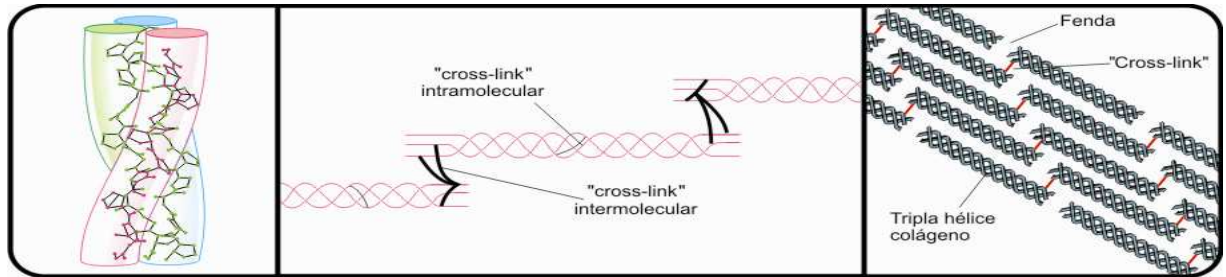


FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DA MOLÉCULA DE COLÁGENO EM TRIPLA HÉLICE E EMODELAGEM DO COLÁGENO  
 FONTE: ADAPTADO DE OPENLEARN.OPEN.AC.UK

modificações mecânicas da ferida, sugerindo que a qualidade das fibras de colágeno tem importância na integridade da anastomose intestinal durante sua cicatrização.

A quantificação de fibras maduras e imaturas de acordo com a sua coloração permite avaliação qualitativa do colágeno em estudos de cicatrização de anastomoses. No entanto, os parâmetros histológicos mesmo quando examinados por patologistas experientes podem apresentar variabilidade entre observadores. A utilização de equipamentos que digitalizam imagens histológicas permite a quantificação de dados morfológicos com minimização de erros. Com esse propósito, vários estudos informatizaram a análise histológica (LEMOS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2003; TRUBIAN, 2004).

Mediante esses recursos pode-se realizar estudo densitométrico que avalia a concentração e qualidade do colágeno, determinando sua maturação no tecido cicatricial. Lemos *et al.* (2004) verificou o efeito da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes e acrescentou às quantificações histológicas de colágeno o índice de maturação do colágeno – IMaC. Esse índice reflete a maturidade do colágeno presente em determinado campo histológico ao estabelecer a razão entre as porcentagens de colágeno tipo I e tipo III.

## 2.2 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição traz impacto negativo para os pacientes; aumenta a morbidade e mortalidade com conseqüente maior permanência e custo hospitalar.

A desnutrição em pacientes internados é uma realidade e um desafio constante para os médicos. Correia e Campos (2003), em estudo multicêntrico na América Latina, encontraram desnutrição em 50,2% dos pacientes estudados, com desnutrição grave em 11,2%. Estudo semelhante em hospitais brasileiros mostrou resultados semelhantes com 48,1% e 12,6%, respectivamente (WAITZBERG; CAIAFFA; CORREIA, 2001).

Trabalhos clínicos avaliaram a influência da desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas. Golub *et al.* (1997), em análise multivariada de fatores de risco de fístulas anastomóticas, encontrou relação entre baixos níveis séricos de albumina com aumento de 2,8% para 6,9% de fístulas. Mäkelä, Kiviniemi e Laitenin (2003) correlacionaram albumina abaixo de 3,5 g/dl com maior incidência de fístulas de anastomose de cólon esquerdo. Por outro lado estudo prospectivo de 391 pacientes não associou albumina abaixo de 3,0 g/dl com fístula (KONISHI; WATANABE; KISHIMOTO, 2006)

O efeito da desnutrição na cicatrização das anastomoses experimentais de cólon ainda não está totalmente definido.

Daly, Vars e Dudrick (1972), em estudo clássico, realizaram anastomose em segmento descendente do cólon de 124 ratos, os quais foram divididos em oito grupos de acordo com o tempo de nutrição pré-operatória (uma, duas, quatro e seis semanas) e o tipo de dieta fornecida (hipoprotéica e normal). As dosagens de proteínas e albumina reduziram-se nos grupos de dieta hipoprotéica confirmando a desnutrição. A perda ponderal entre os ratos desnutridos variou de 2% a 26%, enquanto o grupo controle ganhou em média 12% de peso. Concluíram que à medida que progredia a perda de peso, havia redução linear na pressão de ruptura da anastomose e nos níveis de albumina. Esses resultados ressaltam o prejuízo da desnutrição sobre as propriedades mecânicas da anastomose colônica.

Irvin e Hunt (1974) determinaram a força tênsil e a deposição de colágeno em 260 ratos submetidos à anastomose colônica. Naquele estudo somente os animais desnutridos durante sete semanas e sacrificados no sétimo dia pós-operatório tiveram diminuição significativa das medidas de força e de colágeno da anastomose

em relação aos seus controles. As medidas de pressão de ruptura não tiveram correlação com as alterações do colágeno na avaliação de graus menores de desnutrição, sugerindo que essa variável mecânica não seria um método sensível nesses casos. Os autores sugerem que intervenções nutricionais sejam feitas, na tentativa de reverter o quadro de desnutrição para melhorar esses resultados. Em estudo subsequente a suplementação de aminoácidos por via enteral não melhorou de maneira significativa os parâmetros de cicatrização da anastomose do cólon (IRVIN, 1978).

Ward *et al.* (1982) simularam o nível de desnutrição comumente visto em pacientes submetidos à anastomose colorretal (perda de 12,5% do peso corporal) e avaliaram a influência dessa depleção nas propriedades mecânicas de anastomoses em cólon esquerdo de ratos. Dividiram 42 ratos em três grupos: Grupo A (18 ratos que receberam ração normal durante todo estudo); Grupo B (12 ratos que receberam dieta hipoprotéica antes da cirurgia e ração normal no pós-operatório) e Grupo C (12 ratos que receberam dieta hipoprotéica durante todo o estudo). Os animais foram alimentados com as respectivas dietas durante sete dias antes da operação e sacrificados no sétimo dia pós-operatório. Os resultados demonstraram que os grupos A e B tiveram médias de pressão de ruptura similares, que foram significativamente maiores que a média do grupo C. Vale ressaltar que no momento da cirurgia os níveis de albumina eram semelhantes, porém no momento da avaliação mecânica da anastomose níveis de albumina menor no grupo de dieta hipoprotéica.

Law e Ellis (1990) em pesquisa para avaliar o efeito da nutrição parenteral (NP) na cicatrização da anastomose do cólon no quinto dia encontraram diminuição na pressão de ruptura em ratos submetidos à dieta hipoprotéica. Houve correlação entre dosagem de albumina e cicatrização da anastomose. O efeito deletério da desnutrição protéica foi parcialmente revertido pela NP.

Leite *et al.* (1993) compararam a cicatrização da anastomose de cólon em ratos sob dieta hipoprotéica. Verificaram diminuição da força de ruptura das anastomoses intestinais nos animais com carência protéica em relação aos respectivos controles. Nos animais com carência protéica os valores da concentração do colágeno na cicatriz, foram menores do que nos controles em quatro e sete dias pós-operatórios e maiores em 14 e 21 dias.

Karahasanoglu *et al.* (1998) encontraram diminuição da pressão de ruptura da anastomose do cólon em ratos submetidos à dieta hipoprotéica por dez dias em comparação com dieta normal. Não houve diferença nos níveis de hidroxiprolina bem como não houve melhora no grupo desnutrido com o uso de hormônio do crescimento.

Em estudo que avaliou o efeito da desnutrição pré-operatória na cicatrização da anastomose colônica em ratos, Gonçalves (2005) utilizou modelo *pair feeding* com 50% da ração para o grupo desnutrido. Obteve perda de 26% no peso após 21 dias acompanhado de diminuição da albumina. Estes animais submetidos à anastomose colônica e estudo tensiométrico no quinto dia pós-operatório apresentaram diminuição da força máxima de tração (FMT) e da força de ruptura total (FRT). A deposição de colágeno maduro foi menor no grupo desnutrido. A nutrição pré-operatória nos ratos desnutridos também foi avaliada. Houve aumento do percentual de deposição de colágeno tipo I (maduro). O grupo que recebeu nutrição pré-operatória alcançou níveis semelhantes aos do grupo controle em relação à FMT e FRT; entretanto, valores de colágeno maduro, apesar de superiores aos do grupo desnutrido, ainda foram significativamente inferiores aos do grupo controle.

Ferreira *et al.* (2006), utilizaram método semelhante de desnutrição. Demonstraram redução significativa de peso no grupo desnutrido, embora sem diferença nas dosagens de albumina sérica. A mortalidade pós-operatória no grupo desnutrido foi de 53% enquanto no grupo controle apenas 6%. O grupo desnutrido apresentou mais abscessos, deiscências e peritonites. Não houve diferença na dosagem de hidroxiprolina na anastomose no sétimo dia pós-operatório.

Schmitz (2006) avaliou os efeitos da nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos. O método de desnutrição foi o *pair feeding* com 50% da ração para o grupo desnutrido por 21 dias. Realimentou os animais durante seis dias antes e quatro dias após a cirurgia com ração *ad libitum* suplementada com glutamina ou com glicina. A perda de peso no período de desnutrição foi de 15%. A avaliação mecânica da anastomose não demonstrou diferença entre os grupos tanto na FMT quanto na FRT. A densitometria do colágeno avaliada pelo índice de maturação do colágeno também não demonstrou diferença entre os grupos do estudo. Concluiu que a

suplementação perioperatória oral de glutamina não tem efeito na cicatrização de anastomoses de ratos desnutridos.

## 2.3 SEPSE

Sepse é a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) desencadeada por uma infecção. O diagnóstico é determinado pela presença de pelo menos dois dos seguintes parâmetros clínicos: (a) hipotermia ( $<36^{\circ}\text{C}$ ) ou hipertermia ( $>38^{\circ}\text{C}$ ), (b) taquicardia ( $>90$ ), (c) taquipnéia ( $>20$  mrm) ou hiperventilação com  $\text{PaCO}_2 <31$  mm Hg, ou (d) leucocitose (12.000) ou mais de 10% de neutrófilos imaturos ou leucopenia ( $<4.000$ ) (BONE; GRODZIN; BALK, 1997).

A sepsé é uma afecção bastante freqüente e crescente, com grande mortalidade e alto custo para os sistemas de saúde. Estima-se que em 1995 ocorreram 750.000 casos nos EUA com 215.000 óbitos ou 29%, variando de 10% na infância para 38,4% em idosos com mais de 85 anos. O abdome é foco da infecção em 10% a 22% dos casos. O custo médio de tratamento foi de 22 mil dólares podendo chegar a 50 mil (ANGUS *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003; VINCENT *et al.*, 2006).

Na fisiopatologia da sepsé está envolvida uma cascata inflamatória, antiinflamatória, de coagulação e anticoagulação (RICE; BERNARD, 2005).

Entre os agentes que podem desencadear a sepsé pode-se citar a endotoxina como o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram negativas, peptidoglican e flagelos das bactérias Gram negativas e Gram positivas, ácido lipotecóico das bactérias Gram positivas e outros antígenos de agentes infecciosos.

Na origem da sepsé está a interação entre antígenos bacterianos e leucócitos circulantes, como o evento que desencadeia a seqüência de repostas proinflamatórias e antinflamatórias que são responsáveis pela sepsé (BONE; GRODZIN; BALK, 1997; REINHART; KARZAI, 2001; ANNANE; BELLISSANT; CAVAILLON, 2005). A interação é comandada pela resposta imune inata, tanto celular (monócitos, neutrófilos e macrófagos) quanto por proteínas solúveis (citocinas, complemento e proteínas de fase aguda).

Os macrófagos e monócitos representam a primeira linha de defesa. Migram para o foco da infecção e desempenham um papel regulador na resposta inicial.

Estes liberam fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) resultando na produção e liberação na circulação de citocinas próinflamatórias, incluindo interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) (ABREU; ARDITI, 2004). Estas citocinas desencadeiam vários eventos próinflamatórios adicionais através de células endoteliais, leucócitos e ativam a transcrição de genes para a síntese de proteínas próinflamatórias (GLÜCK; OPAL, 2004; RICE; BERNARD, 2005).

O TNF-  $\alpha$  é o principal mediador da resposta inflamatória aguda às bactérias Gram-negativas e é o responsável por muitas das complicações sistêmicas das infecções graves. A maior fonte de TNF-  $\alpha$  são os macrófagos e a principal função biológica é estimular o recrutamento e ativar neutrófilos e monócitos para erradicar bactérias. Em quantidades moderadas também produz febre, induz a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado e de leucócitos pela medula óssea. Em grandes quantidades induz ao choque, baixo débito, trombose intravascular e hipoglicemia (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

A IL-6 é uma citocina inflamatória potente, produzida por monócitos/macrófagos, linfócitos e outros tipos de células, como as epiteliais. A expressão da IL-6 é induzida por outros mediadores próinflamatórios, em especial IL-1, TNF e LPS. Apresenta múltiplas funções, incluindo indução da febre, diferenciação das células B para produzir imunoglobulinas, proliferação de células T e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (GOSAIN; GAMELLI, 2005).

Embora esta resposta inflamatória inicial seja vital para a defesa do organismo contra infecção, a atuação do TNF- $\alpha$  em conjunto com IL-1, produz os sinais e sintomas próprios da sepse e seus efeitos sinérgicos são provavelmente responsáveis pela hipotensão e disfunção orgânica múltipla vista no início da evolução da sepse grave (ANNANE; BELLISSANT; CAVAILLON, 2005).

Ao mesmo tempo TNF-  $\alpha$  e IL-1 estimulam leucócitos para liberar citocinas antiinflamatórias, incluindo IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  que inibem a síntese de citocinas próinflamatórias e exercem efeito antiinflamatório direto nos monócitos, macrófagos e células endoteliais (VAN DER POLL, 2001).

Esta síndrome da resposta antiinflamatória compensatória tenta manter localizada uma resposta inflamatória que seria sistêmica. Muitas vezes esta resposta supera a resposta próinflamatória na fase final da sepse resultando em paralisia imune, com incapacidade de desencadear resposta imune efetiva para uma eventual

infecção adicional, aumentando o risco para infecção e mortalidade hospitalar (BONE; GRODZIN; BALK, 1997)

Recentes avanços na compreensão da sepse incluem a participação do sistema de coagulação e anticoagulação e sua intrincada relação com a resposta inflamatória. Em conjunto com a resposta inflamatória sistêmica, a sepse resulta na perda da homeostase da coagulação, com ativação de plaquetas, iniciação de vias pro coagulantes e diminuição de mediadores anticoagulantes. A coagulopatia na sepse varia desde leve baixa na contagem de plaquetas e aumento no tempo de protrombina até a coagulação vascular disseminada, resultando em trombose microvascular que causa hipóxia tecidual local e subsequente disfunção do órgão (AIRD, 2001).  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-1 estimulam a liberação de fator tecidual (TF) dos monócitos e neutrófilos que atua sobre a via extrínseca da coagulação resultando na formação de trombina e coágulos de fibrina (AIRD, 2001). O TF também se combina com o fator VII e ativa o fator X, que produz trombina a partir da protrombina. A trombina estimula a formação de coágulos de fibrina na microcirculação para limitar a infecção ao seu foco primário. Resultam disso áreas com microtrombos intravasculares localizados com áreas de hipoperfusão, isquemia, necrose e disfunção do órgão afetado. A trombina, o complexo TF-fator VII e o fator X ativado também atuam como potentes mediadores inflamatórios, realimentando a resposta proinflamatória (AMARAL; OPAL; VINCENT, 2004).

Da mesma forma que a resposta proinflamatória, também há um sistema de regulação da coagulação na sepse. A formação de coágulos de fibrina é reduzida por quatro mecanismos de regulação do sistema de coagulação: inibidor da via do fator tecidual, proteína C ativada, antitrombina e sistema fibrinolítico. Durante a sepse ocorre a supressão destes fatores, redução da fibrinólise promovendo um ambiente favorável à coagulação (RICE; BERNARD, 2005)

### 2.3.1 Lipopolissacarídeo

As múltiplas faces da sepse e sua importância epidemiológica implicam na necessidade de novos estudos para esclarecer sua fisiopatologia, eficácia de novas estratégias terapêuticas, segurança de novas drogas ou para testar novas



modalidades diagnósticas. Os estudos experimentais em animais têm papel importante nestas pesquisas.

Vários modelos para estudo da sepse foram desenvolvidos (DEITCH, 1998; PARKER; WATKINS, 2001). A endotoxemia desencadeada pelo LPS é um dos mais comumente empregados para induzir um estado semelhante à sepse em experimentos animais. Apresenta algumas vantagens como facilidade, precisão da dosagem e reprodutibilidade (FINK; HEARD, 1990).

As endotoxinas são substâncias biologicamente caracterizadas pela capacidade de produzir febre e, em doses suficientes, choque e óbito. Também pode-se definir como substâncias que induzem inflamação mediante interação com receptores de alta afinidade e específicos nos leucócitos (BEUTLER; RIETSCHEL, 2003).

O LPS é um componente constante e vital da membrana celular das bactérias Gram negativas. Divide-se em duas partes específicas na sua composição bioquímica: polissacarídea e lipídica (FIGURA 3).

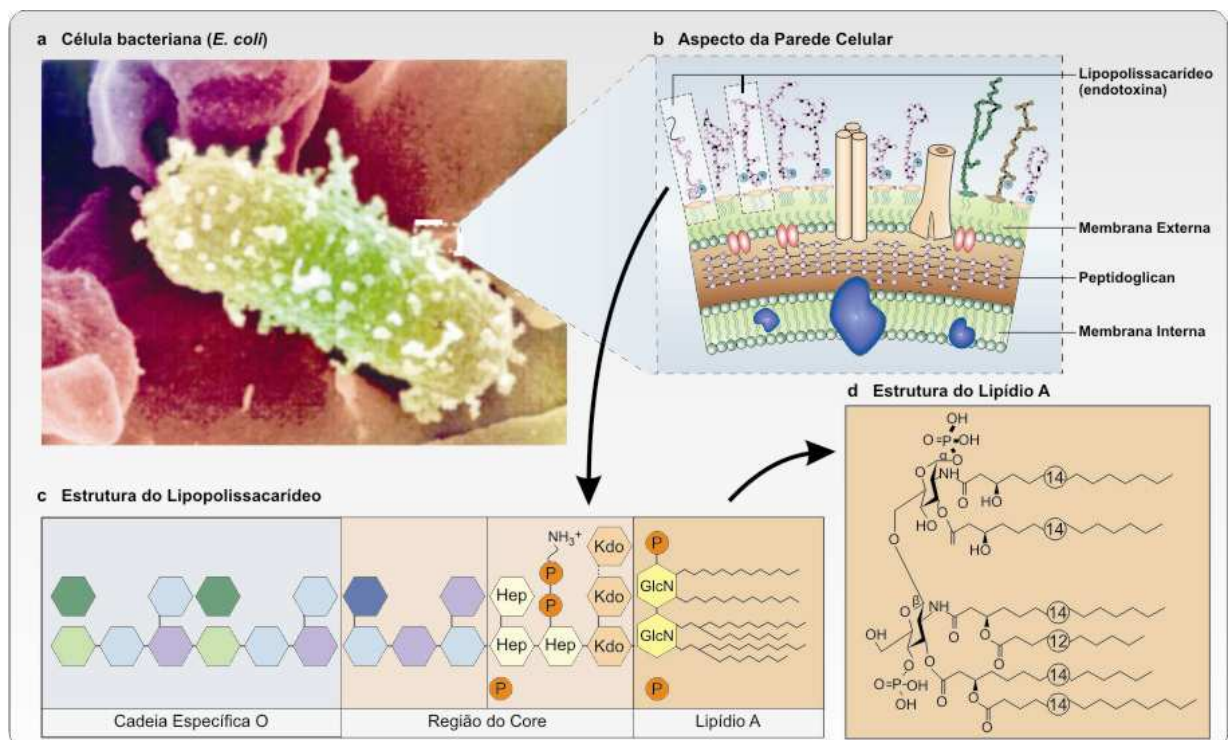


FIGURA 3 – ELETROMICROGRAFIA DA *E. COLI*, DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E SUA LOCALIZAÇÃO NA PAREDE BACTERIANA. FONTE: ADAPTADO DE BEUTLER; RIETSCHEL, 2003.

O lipídio A serve como âncora à parede externa da bactéria. Está presente em todas as bactérias Gram-negativas, é mal reconhecida pelo sistema imune

específico e é responsável pela endotoxemia provocada pelo LPS (BERCZI, 1998; ERRIDGE; BENETT-GUERRERO; POXTON, 2002).

A cadeia polissacarídea é bastante variável, difere de uma bactéria para outra e contém epitopos para resposta imune específica e permite a classificação sorológica das bactérias Gram negativas (BERCZI, 1998; ERRIDGE; BENETT-GUERRERO; POXTON, 2002).

Considerando-se que a sepse em humanos em geral tem algum fator que mantém o estímulo proinflamatório, como pneumonia e peritonite, algumas estratégias podem ser empregadas para simular a sepse ou o choque séptico com o LPS. Entre elas, a aplicação de baixas doses repetidas por um período de dias ou a infusão contínua de baixas doses (FINK; HEARD, 1990). Em geral estes modelos apresentam um importante grau de disfunção orgânica, especialmente renal e pulmonar, presentes no estado hiperdinâmico da sepse.

### 2.3.2 Mecanismo de ação do LPS

Após infecção por bactérias Gram-negativas ou após injeção de LPS, a proteína ligadora de LPS (LBP), presente na circulação e produzida pelo fígado, combina-se com lipídio A. A LBP aumenta muito após exposição ao LPS e funciona como uma opsonina, aumentando sua interação com as moléculas de CD14 da superfície celular, presente nos macrófagos, monócitos e neutrófilos granulócitos. Este complexo também parece envolver MD2, uma pequena proteína associada à porção externa do *toll-like receptor 4* (TLR-4) na superfície celular (BERCZI, 1998; BEUTLER; POLTORAK, 2001, DIKS; RICHEL; PEPPELENBOSCH, 2004) (FIGURA 4).

O receptor TLR-4 é o principal receptor para o LPS. O LPS ligado ao LBP e CD14 liga-se ao receptor transmembrana TLR-4. Este complexo inicia um sistema de sinalização intracelular que resulta na produção e liberação de TNF-  $\alpha$ , IL-1 e IL-6, responsáveis pela resposta inflamatória sistêmica mediada pelos monócitos e macrófagos (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Após a aplicação de uma dose única de LPS ocorre rápida resposta proinflamatória. A concentração do TNF-  $\alpha$  aumenta 60 a 90 minutos após a aplicação intraperitoneal do LPS (BERCZI, 1998).

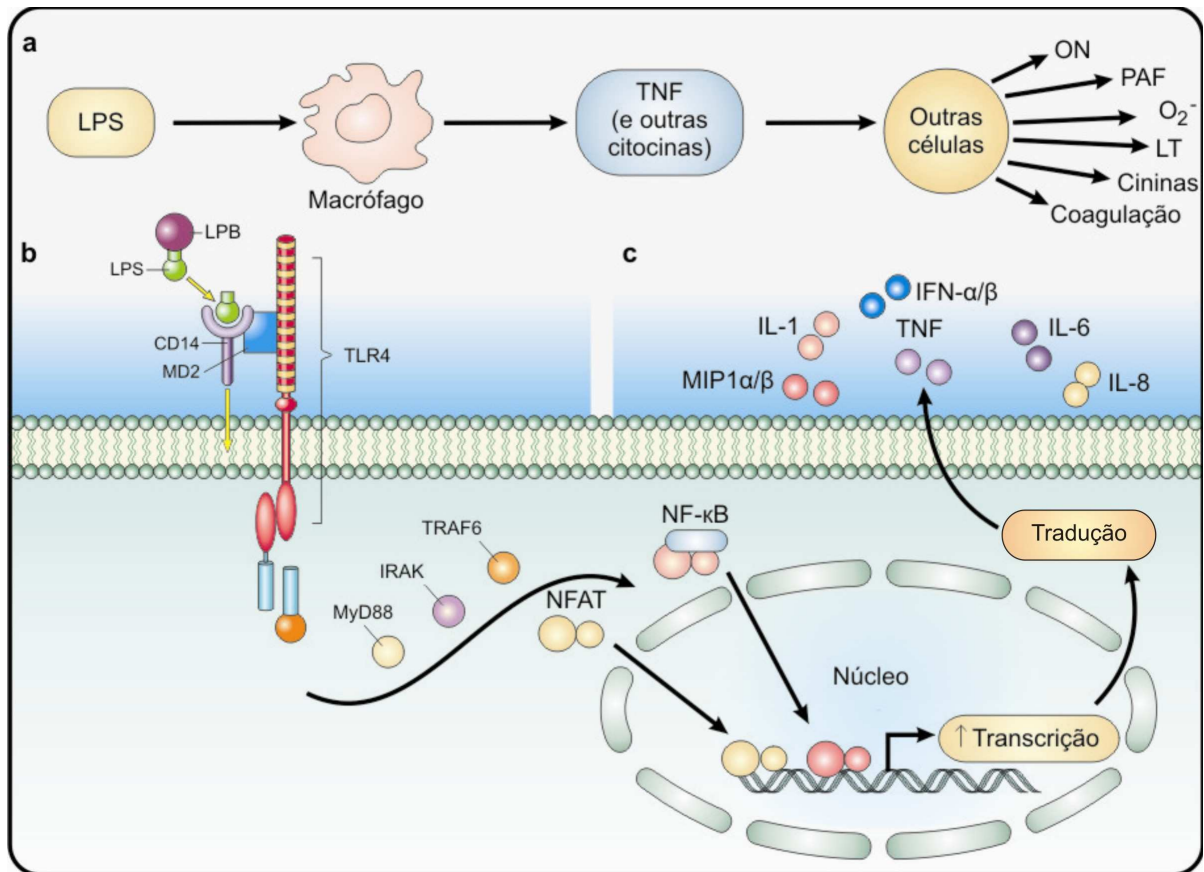


FIGURA 4 – MECANISMO DE AÇÃO DO LIPOPOLISSACARÍDEO NO DESENCADEAMENTO DA SEPSE

LEGENDA: LPS = lipopolissacarídeo; TNF= fator de necrose tumoral; NO= óxido nítrico; PAF= fator ativador de plaquetas; LBP= proteína ligadora de LPS; CD14= conjunto de diferenciação 14; MIP1= proteína inflamatória do macrófago 1; IFN= interferon; IL-6= interleucina 6; IL-8= interleucina 8; IL-1= interleucina 1; PI3K= fosfatidilinositol 3 quinase; MAPK= proteína quinase mitogênica ativada; SAPK= proteína quinase de stress ativada; NFAT= fator nuclear ativado; NF-κB= fator nuclear K B.

FONTE: ADAPTADO DE BEUTLER; RIETSCHER, 2003.

A proteína C reativa (PCR) é uma molécula que reconhece patógenos e se liga ao LPS de algumas bactérias e fungos, ativa o complemento, induz quimiotaxia e aumenta a fagocitose por leucócitos e monócitos. Também estimula a síntese de IL-1 e TNFα e potencializa a atividade citotóxica do linfócito T (BERCZI, 1998).

### 2.3.3 Tolerância ao LPS

A tolerância à endotoxina é um fenômeno que ocorre após a aplicação de mais de uma dose de LPS. É definido como uma diminuição da resposta a novos contatos com LPS, após um primeiro contato com esta endotoxina. O mecanismo

ainda não está esclarecido, mas envolve macrófagos, glicocorticóides, prostaglandinas e interleucina 10 (IL-10) (CAVAILLON *et al.*, 2003).

Gaillard *et al.* (2000) após aplicação de três doses de LPS em ratos, via endovenosa, nas doses de 12,5; 25 ou 50µg/kg nos dias um, três e cinco, demonstraram resposta de TNF- $\alpha$ , hormônio adrenocorticotrófico e de corticosterona intensa na primeira dose, menor na segunda e não obtiveram resposta nestas dosagens na terceira aplicação do LPS.

Takemura *et al.* (1997) avaliaram a corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico após aplicação repetida de LPS durante seis dias em ratos, na dose de 0,25 mg/kg. Demonstraram que na primeira aplicação houve aumento significativo em comparação com grupo que recebeu solução salina e no sexto dia um aumento menor.

## 2.4 SEPSE E CICATRIZAÇÃO ANASTOMOSE

A realização de uma anastomose na presença de sepse intraperitoneal é ainda uma questão controversa. Diverticulite com perfuração é o exemplo mais comum, e ainda não está estabelecida a segurança ou não da anastomose primária. Trabalhos experimentais refletem esta dúvida.

Ahrendt, Gardner e Barbul (1994) usando ligadura e perfuração cecal (LPC) como modelo de peritonite, e Hesp *et al.* (1984), usando cápsulas com fezes humanas, mostraram que a peritonite reduz o conteúdo de colágeno do cólon. Fazer a anastomose do cólon após a LPC resultou em diminuição da formação de colágeno na anastomose e até 3 cm acima da linha de sutura. Ocorreu também diminuição da pressão de ruptura. O mesmo modelo de peritonite também alterou a expressão do gene do colágeno.

Os mesmos autores, dois anos mais tarde, realizaram LPC em ratos, seguida de anastomose colônica após 24 horas. Os animais foram sacrificados um e quatro dias após a anastomose. Avaliaram síntese de colágeno por hidroxiprolina e expressão de genes por RNA de colágenos tipo I e tipo III, comparando com o cólon intacto. A infecção intra-abdominal não alterou a síntese de colágeno no cólon intacto, porém, a síntese de colágeno esteve diminuída na anastomose. Houve também aumento na expressão do gene do colágeno tipo I após 24 horas da

anastomose que não se manteve no quarto dia. O inverso ocorreu no cólon intacto (AHRENDT; TANTRY; BARBUL, 1996).

Ergin *et al.* (2004) analisaram os efeitos de imunomoduladores na anastomose colônica em ratos submetidos a sepse intra-abdominal por LPC. A anastomose colônica foi realizada no cólon distal e no mesmo tempo operatório foi feita a LPC. Após 24 horas o ceco foi ressecado. No quarto dia de pós-operatório sacrificaram os animais. Observaram diminuição da pressão de ruptura da anastomose colônica nos animais sépticos quando comparados com o grupo controle. Também ocorreu redução nos níveis de hidroxiprolina no grupo submetido à LPC. Estes efeitos foram parcialmente reduzidos pelo uso dos imunomoduladores levamisole e G-CSF.

Contrastando com os resultados acima, de Hing *et al.* (2003) demonstraram que a presença de peritonite por LPC teve efeito transitório e limitado no ganho de resistência da anastomose em ratos. Após 24 horas de LPC, realizaram anastomose no cólon distal com ressecção do ceco. A avaliação mecânica da anastomose foi feita pela força de tração e pressão de ruptura no pós-operatório imediato, primeiro, segundo, terceiro e quinto dias pós-operatórios. Houve diminuição na força de tração apenas no pós-operatório imediato e na pressão de ruptura apenas no terceiro dia pós-operatório. Não houve diferença nos demais dias. A concentração de hidroxiprolina na anastomose não foi alterada pela infecção intra-abdominal. Não houve também sinais clínicos de fístula no grupo submetido à LPC.

Orlando *et al.* (1999) avaliaram o efeito da infecção peritoneal na anastomose de cólon e intestino delgado em ratos. Utilizaram a LPC com 12 horas de duração, seguida pela ressecção do ceco no grupo da LPC e anastomose de intestino delgado e de cólon. No grupo controle apenas as anastomoses. No quarto dia pós-operatório determinaram a força de tração e concentração de hidroxiprolina nas anastomoses. Não houve diferença nestes parâmetros em comparação com grupo controle sem infecção. Conclui que a anastomose primária seria segura após infecção abdominal de curta duração no pré-operatório.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Aplicaram-se, neste trabalho, as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2007). Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná. Foram obedecidos os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### 3.1 MATERIAL

Foram utilizados 45 ratos Wistar (*rattus norvegicus albinus*, *roentia mamalia*) machos, adultos, com idade variando de 80 a 100 dias, oriundos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com capacidade para cinco animais, por um período de sete dias para aclimação. Receberam água e ração para ratos (NUVILAB-CR1®, Nuvital, Colombo- Paraná) *ad libitum*. Após o período de aclimação, os ratos foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais. As condições ambientais do laboratório foram: temperatura de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas, controlados eletronicamente (Cronomat®, Mallory do Brasil, São Paulo-SP).

#### 3.2 MÉTODO

##### 3.2.1 Grupos de estudo

Após os sete dias de aclimação os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com o tipo de alimentação que receberiam durante o experimento, e foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais.

O peso médio dos grupos no início do experimento foi 264,32g com  $DP\pm 21,55\text{g}$  e os pesos homogêneos.

O Grupo Controle Nutrido – GCN – (n=15) recebeu ração para ratos (NUVILAB-CR1, Nuvital, Curitiba - Paraná) e água *ad libitum* durante todo o experimento. No 22º, 23º, 24º e 25º dias foram submetidos à aplicação de soro fisiológico a 0,9% (SF 0,9%) intraperitoneal no volume de 0,5 ml/kg de peso. No 26º dia foram submetidos à cirurgia para anastomose colônica e coleta de sangue por punção cardíaca. No quinto dia pós-operatório foram sacrificados e as anastomoses foram retiradas para estudo tensiométrico e avaliação histológica.

O Grupo Nutrido Toxêmico – GNT – (n=15) recebeu ração para ratos (NUVILAB-CR1, Nuvital, Curitiba - Paraná) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Foram submetidos à endotoxemia com Lipopolissacarídeo (LPS) no 22º, 23º, 24º e 25º dias. No 26º dia foram submetidos à cirurgia para anastomose colônica e coleta de sangue por punção cardíaca. No quinto dia pós-operatório foram sacrificados e as anastomoses foram retiradas para estudo tensiométrico e avaliação histológica.

O Grupo Desnutrido Toxêmico – GDT – (n=15) recebeu ração para ratos (NUVILAB-CR1, Nuvital, Curitiba - Paraná) de modo *pair feeding* (50% do peso da ração do grupo controle, determinado diariamente) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Foram submetidos à endotoxemia com LPS no 22º, 23º, 24º e 25º dias. No 26º dia foram submetidos à cirurgia para anastomose colônica e coleta de sangue por punção cardíaca. No quinto dia pós-operatório foram sacrificados e as anastomoses foram retiradas para estudo tensiométrico e avaliação histológica (FIGURA 5).

### 3.2.2 Indução da endotoxemia

Os animais dos grupos GNT e GDT foram submetidos a quatro aplicações de LPS no 22º, 23º, 24º e 25º dias. Foi utilizado LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (SIGMA®- St. Louis-EUA). A dose utilizada foi de 1,0 mg/kg, via intraperitoneal. A



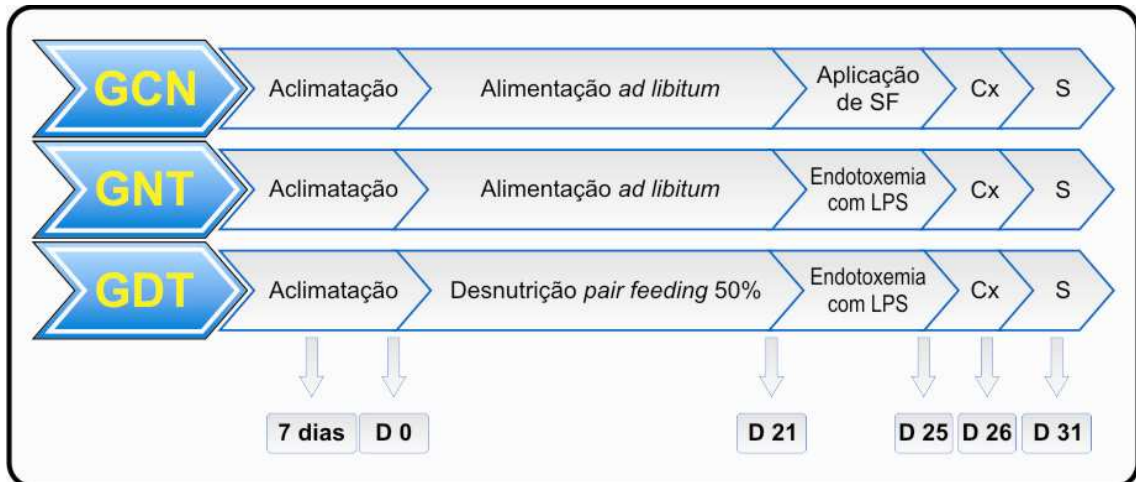


FIGURA 5 – DESENHO DO ESTUDO

LEGENDA: GCN= grupo controle nutrido; GNT= grupo nutrido toxêmico; GDT= grupo desnutrido toxêmico; LPS= lipopolissacarídeo; Cx= cirurgia; S= sacrifício; SF= soro fisiológico. Endotoxemia pelo LPS – 4 doses de 1 mg/kg diárias. Aplicação de SF isovolumétrico.

FONTE: O AUTOR.

diluição foi feita em SF 0,9% estéril, livre de pirógenos, com volume final de 0,5ml equivalente a 1mg de LPS (FIGURA 6).

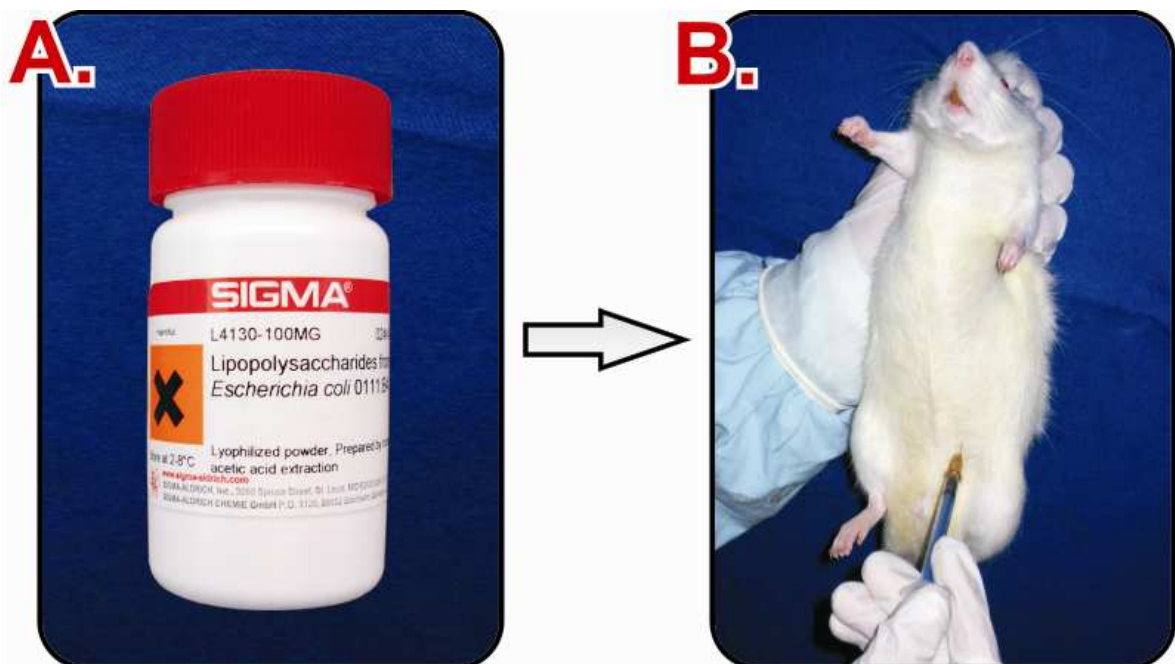


FIGURA 6 – LIPOPOLISSACARÍDEO DE E. COLI (A) E APLICAÇÃO INTRAPERITONEAL PARA INDUÇÃO DA TOXEMIA (B)



### 3.2.3 Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico.

**Anestesia:** Os animais foram submetidos à indução anestésica por inalação de éter etílico (Farmanil Quima® ,Curitiba - PR). Neste momento foram pesados e após, mantidos anestesiados por injeção intramuscular na face interna da pata traseira direita com solução de ketamina 10% (Ketamina Agener®, Agener União, SP) associado ao cloridrato xilazina 2% (Anasedan®, Vetbrands, SP), nas doses de 50 e 10 mg por quilograma (Kg) de peso, respectivamente. A efetividade da anestesia foi avaliada pela ausência de movimentação, pela ausência do reflexo córneo-palpebral e pela inexistência de reação motora após preensão com pinça do coxim adiposo de uma das patas traseiras. Uma vez comprovado o plano anestésico, os animais foram submetidos ao procedimento operatório. Quando necessário, no transoperatório a anestesia foi complementada por inalação de éter etílico em sistema fechado de campânula, através de cone individual.

**Pré-operatório:** Realizou-se tricotomia da região abdominal média numa extensão de 5 cm por 3 cm, fixação do animal à mesa cirúrgica com membros em extensão. Antissepsia com polivinilpirrolidona iodo 1%. Por meio de incisão abdominal mediana de cerca de 3 cm de extensão foi obtido acesso à cavidade peritoneal para a exposição do cólon. Procedeu-se então a duas secções completas do cólon, a primeira no cólon proximal a aproximadamente 5 cm distais da válvula íleo-cecal e a segunda 5 cm acima da reflexão peritoneal do reto, no cólon distal, atentando para a preservação dos vasos cólicos. A reconstrução das duas secções foi realizada mediante anastomose término-terminal em plano único total com oito pontos separados de fio monofilamentar de *nylon* 6.0 (Mononylon® 6.0, Ethicon, São José dos Campos - SP) (FIGURA 7). O fechamento da parede foi feito com sutura contínua ancorada de fio monofilamentar de *nylon* 3.0 (Mononylon® 3.0, Ethicon, São José dos Campos - SP) em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo. Ao final da cirurgia foi aplicado 5 ml de SF 0,9% por via subcutânea no dorso dos animais.

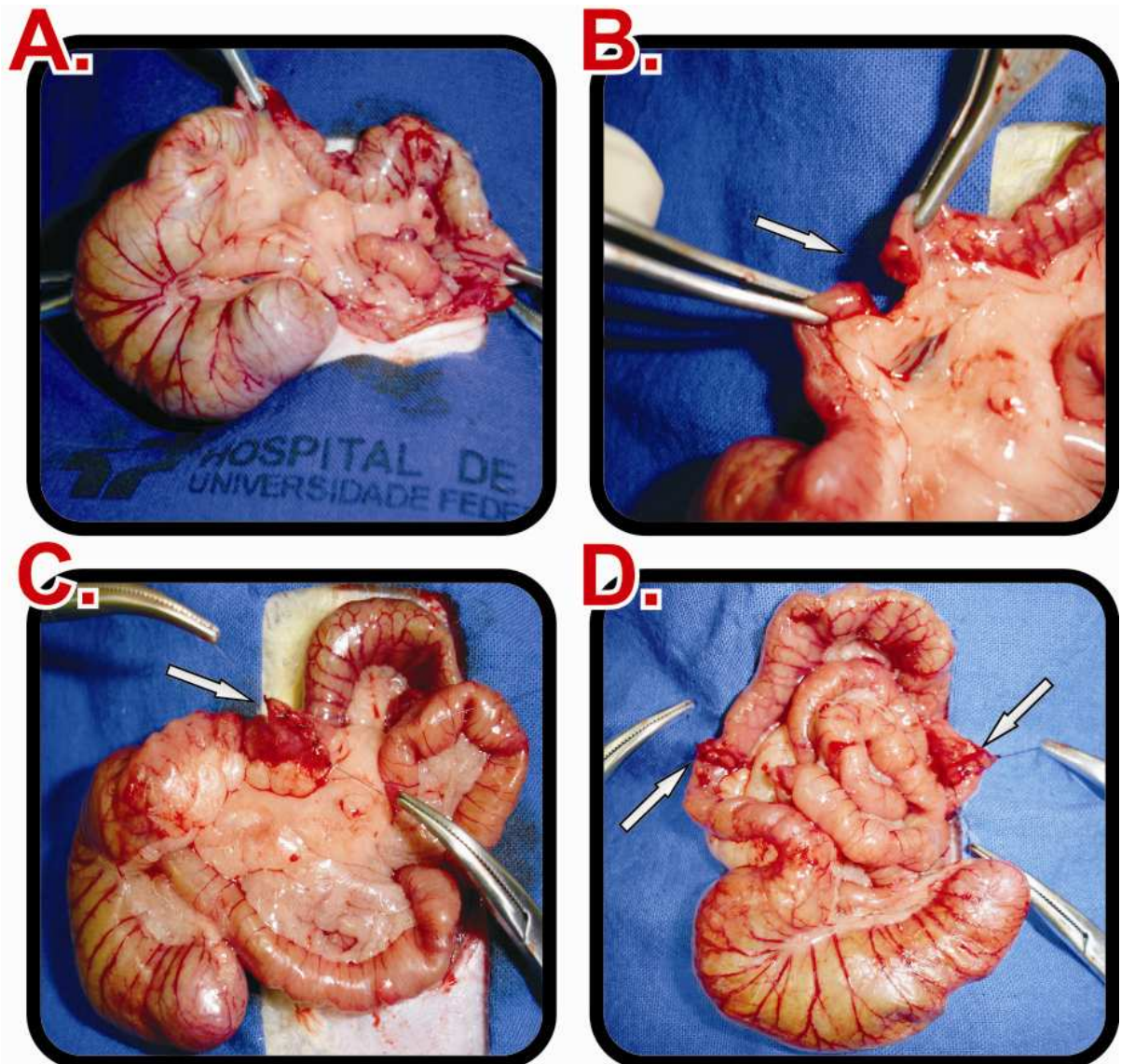


FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DEMONSTRANDO A ANATOMIA (A), SECÇÃO DO CÓLON PROXIMAL (B), ANASTOMOSE PROXIMAL CONCLUÍDA (C) E ASPECTO FINAL APÓS ANASTOMOSE DISTAL (D)

#### 3.2.4 Punção cardíaca

Logo depois de encerrada a cirurgia, os animais foram submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue para avaliação laboratorial. Mantidos em decúbito dorsal, com o polegar era palpado o ponto de maior intensidade dos batimentos cardíacos e puncionado com seringa de 5 ml e agulha 25x8mm (Beckton-Dickinson) esterilizada e apirrogênica. Foram colhidos  $\pm 5$  ml de sangue de cada animal. As amostras foram coletadas em frascos com anticoagulante (EDTA 10%) e sem

anticoagulante para as dosagens de albumina, Proteína C Reativa, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina seis (IL-6).

### 3.2.5 Pós-operatório

Durante a recuperação pós-operatória imediata, os animais foram mantidos aquecidos sob lâmpada e em seguida foram recolocados em suas gaiolas de origem. Após uma hora do procedimento o bebedouro de água foi preenchido com solução glicosada a 10%, contendo 1mg de dipirona por ml para analgesia. A realimentação foi iniciada 12 horas após, na quantidade determinado para cada grupo experimental.

### 3.2.6 Sacrifício dos animais e retirada das peças

Todos os animais foram sacrificados no quinto dia de pós-operatório. Foi utilizada dose letal de éter etílico inalatório. A cavidade abdominal foi reexplorada e após inspeção cuidadosa da cavidade, foi realizada a lise parcial das aderências e a retirada de dois segmentos do cólon, de 5 cm de extensão cada, contendo as anastomoses proximais e distais em suas porções médias. Os dois espécimes cirúrgicos de cada animal foram conservados alternadamente em SF 0,9% e formalina a 10% para estudos de tração e para estudo histológico, respectivamente (FIGURA 8). Para o estudo tensiométrico e histológico foram utilizadas de forma alternada as anastomoses proximal e distal.

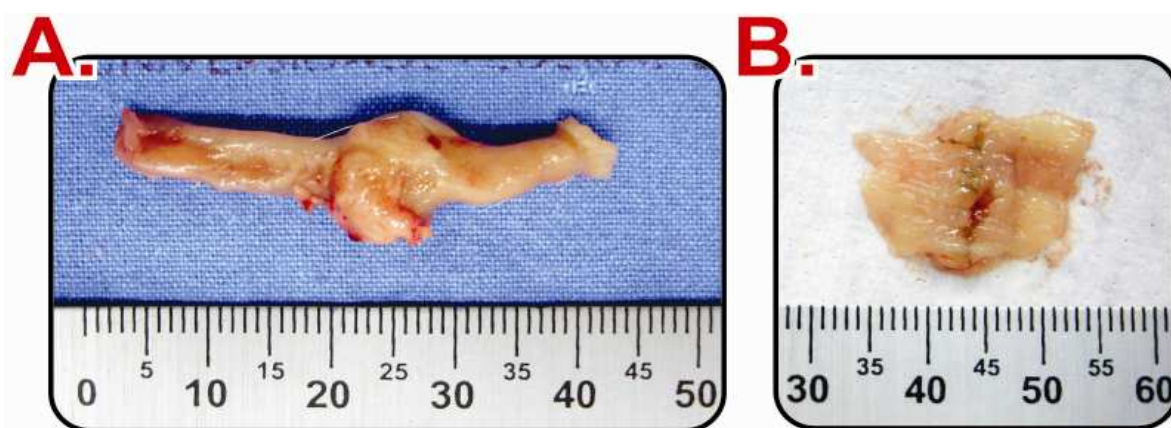


FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DA PEÇA CIRÚRGICA REMOVIDA PARA ESTUDO TENSIONOMÉTRICO (A) E SEGUNDA ANASTOMOSE APÓS ABERTURA DO CÓLON PARA ESTUDO HISTOLÓGICO (B)

### 3.2.7 Dados avaliados

#### 3.2.7.1 Peso

Os animais tiveram seus pesos aferidos após sete dias de aclimação no laboratório e a cada sete dias. Após isso, pesagens diárias para cálculo da dose de SF ou LPS, no dia da cirurgia e no dia do sacrifício. A balança eletrônica utilizada (AM 5500 Marte®, São Paulo - SP) foi aferida pelos padrões do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Os valores dos pesos foram mensurados e registrados em gramas. A variação ponderal serviu como método de avaliação nutricional.

#### 3.2.7.2 Ingesta alimentar média

Diariamente em horário fixo, foi oferecida a cada animal do GCN quantidade fixa de 50 g de ração, cuja composição está apresentada no QUADRO 1. A diferença diária entre o peso da ração ofertada no dia anterior e o peso da ração restante na gaiola metabólica foi anotada como ingesta alimentar. Foi calculada a média da ração consumida pelos animais do GCN.

No GDT a ingesta alimentar correspondeu à oferta de 50% da média da ingesta alimentar do GCN (*pair feeding*), calculada a partir da dieta do dia anterior. O GNT recebeu 50 g de ração diariamente.

#### 3.2.7.3 Estudo tensiométrico

A avaliação da força de tensão da anastomose foi realizada no laboratório do Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná. Para tanto, foi utilizada a máquina universal de ensaio mecânico da marca EMIC, modelo DL-500MF (EMIC, São José dos Pinhais, PR), com garras de pressão ajustável manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados com utilização do *software* TESC, versão 2.0.

QUADRO 1 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAR OS ANIMAIS

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO	
CARBONATO DE CÁLCIO, FARELO DE MILHO, FARELO DE SOJA, FARELO DE TRIGO, FOSFATO BICÁLCICO, CLORETO DE SÓDIO, PREMIX MINERAL VITAMÍNICO, AMINOÁCIDOS (DL-METIONINA E LISINA)	
Umidade	12,5 %
Proteína bruta	22 %
Cálcio	1,4 %
Fósforo	0,8 %
Extrato etéreo	4 %
Material mineral	10 %
Matéria fibrosa	8 %
VITAMINAS: A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, NIACINA, ÁCIDO PANTOTÊNICO, ÁCIDO FÓLICO, BIOTINA e COLINA	
MICROELEMENTOS: FERRO, ZINCO, COBRE, IODO, MANGANÊS, SELÊNIO e COBALTO	

Os dois segmentos colônicos ressecados de cada animal foram selecionados alternadamente para o estudo tensiométrico ou histológico. O segmento utilizado para o estudo tensiométrico foi cuidadosamente dissecado para remoção das aderências e acondicionado em frascos contendo SF 0,9%. O estudo foi realizado por meio de fixação das extremidades do segmento colônico utilizando presilhas de metal.

A anastomose foi posicionada de modo que sua porção média ficasse eqüidistante das duas presilhas. Todos os testes de tração foram feitos logo após a ressecção dos corpos de prova, com intervalo máximo de 3 horas. A tração ocorreu com velocidade de 50 mm/minuto, utilizando-se carga de 10 kg com sensibilidade de 50 g, com margem de erro de 0,5% até a ruptura total do corpo de prova. A força de tração foi constantemente mensurada por meio de computador anexo ao sistema de presilhas (FIGURA 9).



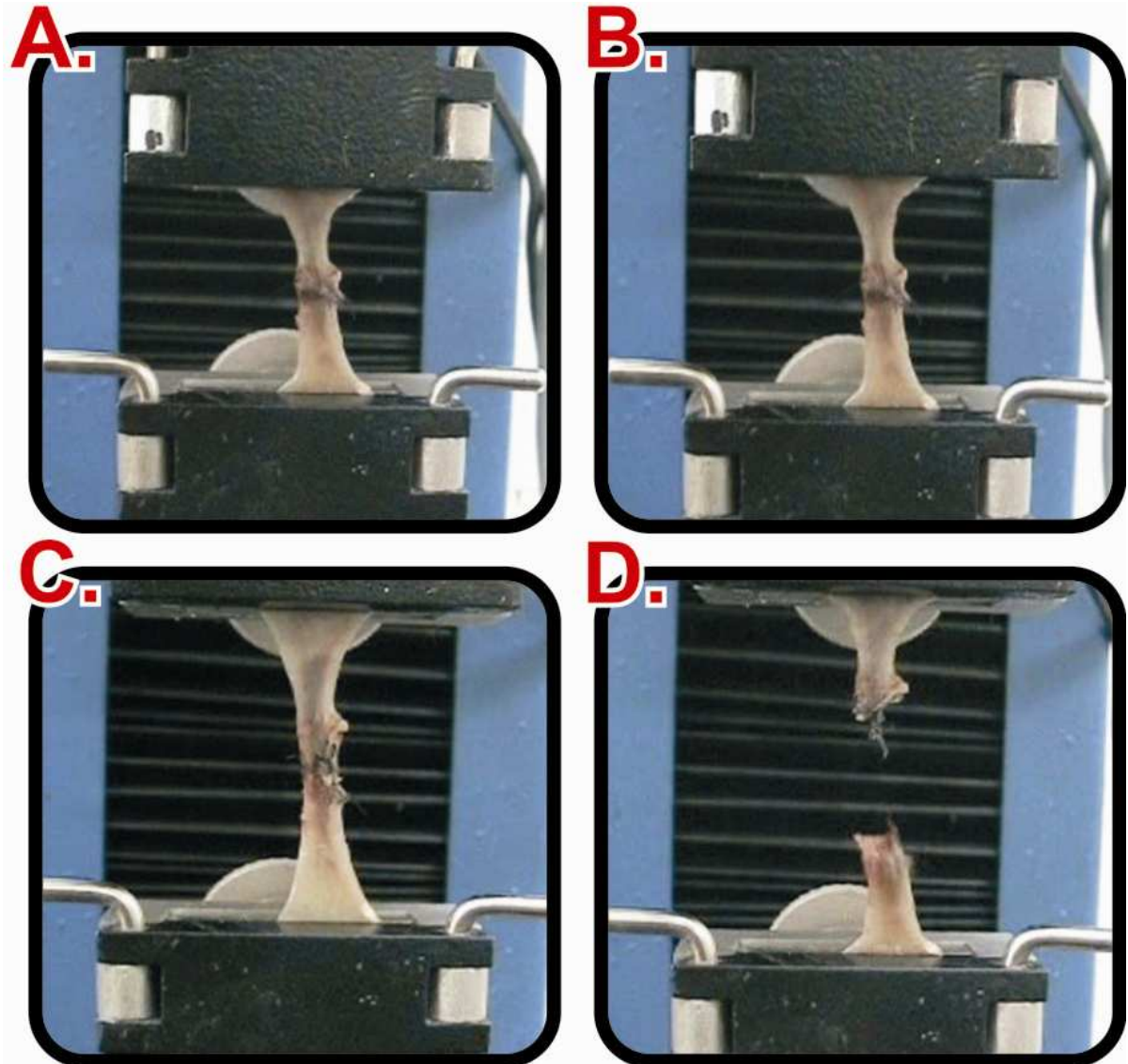


FIGURA 9 – DEMONSTRAÇÃO FOTOGRÁFICA DO ESTUDO TENSIOMÉTRICO DA ANASTOMOSE COLÔNICA. FIXAÇÃO DO CORPO DE PROVA (A), INÍCIO DA TRAÇÃO (B), INÍCIO DA RUPTURA (C) E APÓS RUPTURA COMPLETA DA ANASTOMOSE (D).

O programa demonstrava um sistema de coordenadas cartesianas cujo eixo x representava a unidade Distância e o eixo y a unidade Força. Inicialmente o gráfico apresentou direção ascendente. No momento da ruptura inicial, o gráfico demonstrou a mudança imediata de direção correspondendo à Força Máxima de Tração (FMT) suportada pelo corpo de prova. A FMT é definida como a força máxima suportada pelo tecido antes do início de sua ruptura.

A variável de força FMT foi submetida à análise comparando-se os três grupos de animais (GCN, GNT e GDT).

Os testes nos quais a anastomose se rompeu fora da linha de sutura foram excluídos da avaliação do estudo tensiométrico.

#### 3.2.7.4 Avaliação histológica

Secções perpendiculares ao maior eixo da sutura foram efetuadas e encaminhadas para o processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 4 µm de espessura, os cortes histológicos foram submetidos à coloração de *picrosirius-red* F3BA para identificação de colágenos maduro e imaturo por técnica de microscopia com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada.

Foram avaliados os cortes histológicos por meio de microscópio óptico da marca *Olympus®* (*Olympus*, Tóquio, Japão), em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera *Sony®* CCD 101(*Sony*, Tóquio, Japão), transmitidas ao monitor colorido *Trinitron Sony®*, congeladas e digitalizadas por meio de placas *Oculus TCX*. Foi realizada a análise das imagens por meio de aplicativo *Image Pro-plus* versão 4.5 para *Windows*. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (“*pixels*”) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema RGB (“*Red, Green, Blue*”) foram considerados valores para tons de vermelho, amarelo e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulagem, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo (FIGURA 10).

A partir da medida da porcentagem de fibras colágenas maduras e imaturas foi calculado o índice de maturação do colágeno (IMaC), definido como a razão entre essas porcentagens (QUADRO 2).

QUADRO 2 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ Colágeno tipo I (maduro)}}{\% \text{ Colágeno tipo III (imaturo)}}$$

FONTE: LEMOS, 2004.

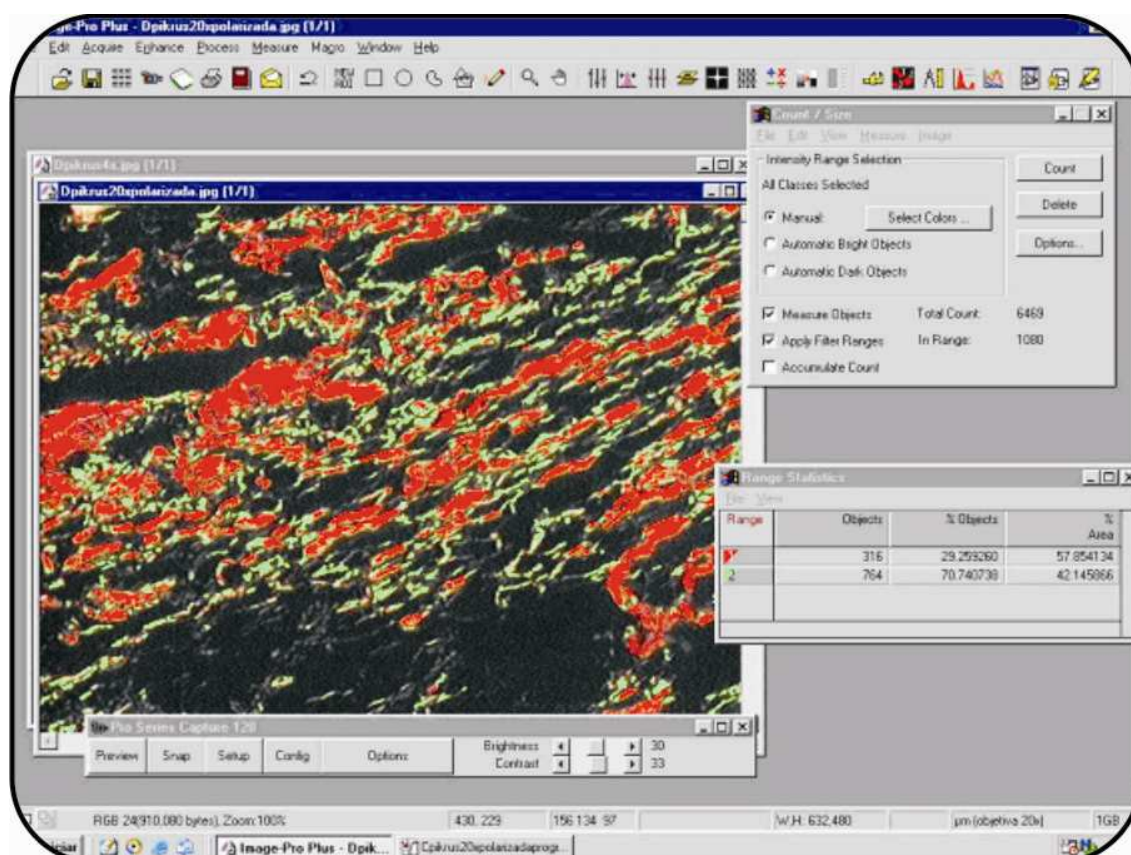


FIGURA 10 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO. IMAGEM DIGITALIZADA APÓS APLICATIVO IMAGE PRO-PLUS, VERSÃO 4.5 ®.

### 3.2.7.5 Imunoistoquímica

Para o estudo imunoistoquímico utilizou-se a técnica descrita por Hsu (1981). Foram utilizadas lâminas salinizadas para se evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação, sendo então imersos em tampão citrato, pH 6,0, para recuperação antigênica em banho-maria a 98°C; em seguida foram imersos em tampão fosfato e submetidos a bloqueio da peroxidase endógena em metanol com peróxido de hidrogênio a 3%. Na sequência aplicaram-se os anticorpos primários antifator VIII (Policlonal, Código 0082, DakoCytomation – Carpinteria, USA) e anti- $\alpha$ -actina muscular lisa (Monoclonal, Código M0851, DakoCytomation, Carpinteria, USA), em lâminas separadas, incubando-as “overnight” à temperatura de 4°C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se a aplicação de anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se a



aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com diaminobenzina, seguido de contracoloração com hematoxilina. Na seqüência os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. As lâminas foram analisadas sem a identificação dos grupos dos animais.

#### Número de Miofibroblastos

A identificação dos miofibroblastos foi realizada contando-se as células coradas positivamente pela coloração imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -actina muscular lisa em campo de grande aumento (objetiva de 40X), em quatro campos distintos aleatoriamente na linha de sutura da anastomose correspondendo a uma área de  $17.726\mu\text{m}^2$ , expressas em médias aritméticas (FIGIRA 11). As imagens digitalizadas foram capturadas e analisadas pelo programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA), para Windows, por meio da ferramenta *Measures*, calibrada previamente para objetiva de 40 vezes. Utilizou-se um sistema constituído por microscópio óptico Olympus® BX50 (Olympus®, Tóquio - Japão), acoplado com câmera de vídeo Sony® DXC-970MD (Sony®, Tóquio - Japão), conectado a computador e monitor colorido de alta resolução da marca Samsung® (Samsung® - Coréia do Sul).

A contagem foi realizada analisando-se as imagens individualmente, marcando-se os miofibroblastos por meio da ferramenta *Manual Tag*.

#### Número de Vasos Sangüíneos

A identificação dos vasos sangüíneos foi efetuada contando-se o número de estruturas circulares coradas positivamente pelo anticorpo policlonal antifator VIII, que revela as células endoteliais da camada íntima dos vasos. A contagem foi feita na área da sutura da anastomose em aumento de 40 vezes, em três campos distintos aleatoriamente, em área de  $17.726\mu\text{m}^2$ , expressas em médias aritméticas (FIGURA 11). Imagens de toda esta região foram capturadas por sistema acoplado ao microscópio óptico Zeiss® Axioscop (Carl Zeiss® - Alemanha), e constituído por uma câmera de vídeo Sony® DXC-970MD (Sony®, Tóquio- Japão).

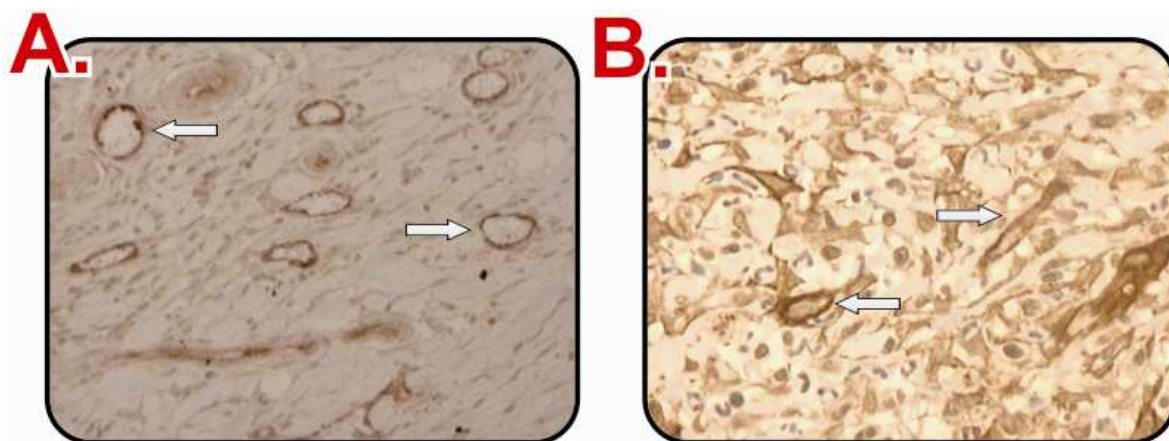


FIGURA 11 – FOTOGRAFIA DO ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DEMONSTRANDO EM MARROM POSITIVIDADE PARA ANTIFATOR VIII (A) E MIOFIBROBLASTOS CORADOS UTILIZANDO ANTICORPO ANTI- $\alpha$ -ACTINA (B)

#### 3.2.7.6 Avaliação laboratorial

Para dosagem de albumina foi utilizado o método colorimétrico, com o verde de bromocresol. A albumina presente na amostra reage com o verde de bromocresol em meio ácido, formando um complexo colorido que é quantificado espectrofotometricamente. A absorvância do complexo formado, medida em 630 nm, é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra analisada.

Na dosagem de Proteína C Reativa foi utilizado o método ultrassensível. O ensaio foi realizado utilizando o aparelho Cobas Mira Plus<sup>®</sup>, em sistema automatizado utilizando o procedimento recomendado pelo fabricante, aumentando o volume da amostra e o padrão para 50 l e usando o calibrador diluído 1:10 com água deionizada. Foi utilizado o soro controle Serodos<sup>®</sup>, para verificar o desempenho do ensaio.

Utilizou-se dosagem imunoenzimática dos níveis séricos do TNF- $\alpha$ . Esta dosagem emprega a técnica imunoenzimática quantitativa na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF- $\alpha$  é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno TNF- $\alpha$ . Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA Tumor Necrosis Factor ELISA System (Amersham Pharmacia code RPN 2718<sup>®</sup>). As amostras de plasma eram distribuídas em cada um dos orifícios da placa, em volumes de 50  $\mu$ l, a seguir eram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Realizaram-se três lavagens totais com tampão fosfatos pH 7,5. Realizou-se então a adição do anticorpo de detecção (anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  conjugado à

peroxidase), em cada um dos orifícios e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Esvaziado o conteúdo da placa por inversão e lavado três vezes com tampão fosfatos pH 7,5. Foi distribuído 20 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios e 10 µl de Ortofenilenodiamino (50mg em 25ml de tampão citrato pH 5,0) e incubado por 15 minutos. Após esta etapa, foi adotada solução 10N de ácido sulfúrico (*stop solution*), para interromper a reação. Realizou-se leitura a 450nm e os valores obtidos para as amostras foram comparadas com curva padrão, que utilizou IL-6 liofilizada de rato. O desenvolvimento da cor indica a presença do TNF- $\alpha$  na amostra, que será diretamente proporcional à leitura espectrofotométrica.

Utilizou-se dosagem imunoenzimática dos níveis séricos da IL-6. Para determinação da produção de citocina, o sangue dos ratos foi coletado em tubos de EDTA, para separação do plasma. Na determinação da IL-6, utilizou-se o kit específico para ELISA (BD OptEIA™, Pharmigen).

As amostras foram pipetadas sobre as escavações de placas de 96 poços (Maxisorp F-96, Nunc) cobertas previamente com anticorpo de captura específico para a interleucina (anticorpo monoclonal anti-rato IL-6), seguido de diversas lavagens e da adição de diluente. Após a colocação das amostras nas escavações, as placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Realizaram-se cinco lavagens totais. Realizou-se então a adição do anticorpo de detecção (anticorpo monoclonal anti-rato IL-6 biotinilado) e incubação por uma hora a temperatura ambiente. Após remoção do excesso do segundo anticorpo, adicionou-se a enzima peroxidase (*avidin-horseradish peroxidase conjugate*). Esta peroxidase se ligou ao anticorpo de detecção para completar a reação. Após a lavagem para remoção de toda a enzima não ligada, colocou-se solução de substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) e as amostras foram inoculadas por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Após esta etapa, foi adotada solução 2N de ácido sulfúrico (*stop solution*), para interromper a reação. Realizou-se leitura a 450nm e os valores obtidos para as amostras foram comparadas com curva padrão, que utilizou IL-6 liofilizada de rato.

### 3.2.7.7 Análise estatística

Procedeu-se a análise estatística julgada adequada conforme a natureza dos dados analisados nos grupos GCN, GNT e GDT. Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico, com os resultados expressos como média  $\pm$  erro-padrão (EP). Para verificar a diferença entre as médias dos pesos no 1º dia entre os grupos GCN, GNT e GDT usou-se a análise da variância. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as variáveis: pesos no 1º dia entre GCN e GNT, GNT e GDT; PCR entre GCN e GNT, GCN e GDT; IMaC entre GCN e GNT, GCN e GDT, GNT e GDT; Para as demais comparações utilizou-se a análise paramétrica com o teste t de Student. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

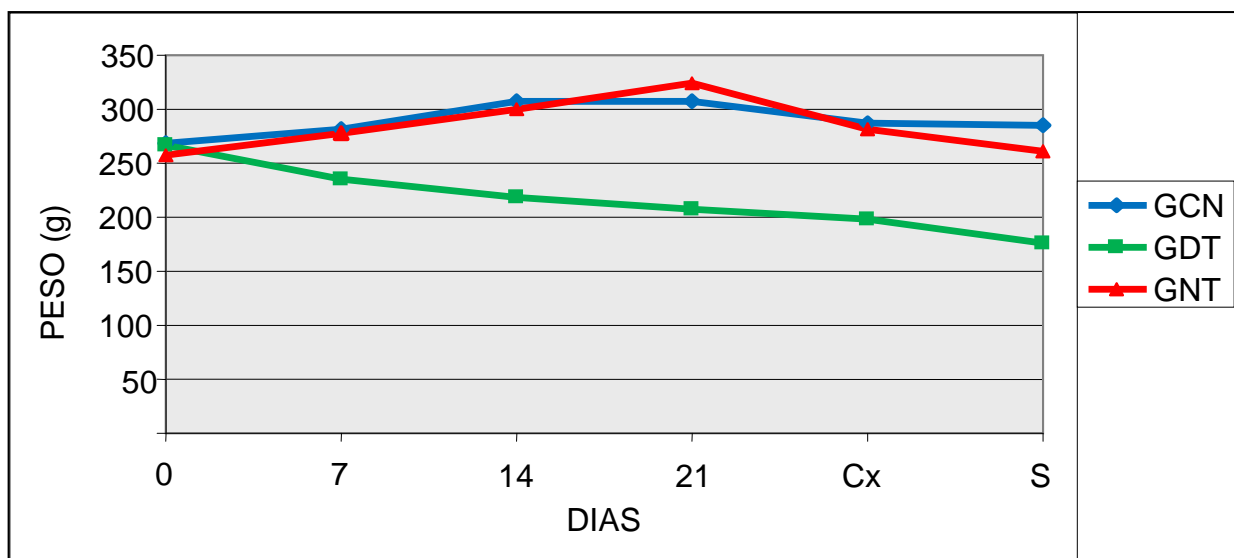
## 4 RESULTADOS

A pesquisa foi iniciada com 45 animais e 37 completaram todas as fases do estudo. A taxa de mortalidade total foi de 17,7%, ocorrendo nas seguintes fases: um durante a fase de desnutrição, dois durante a indução da toxemia e cinco no pós-operatório. Não houve óbito no grupo controle nutrido (GCN), dois óbitos (25%) no grupo nutrido toxêmico (GNT) e seis óbitos (75%) no grupo desnutrido toxêmico (GDT).

### 4.1 Peso

As médias de pesos dos animais variaram conforme o grupo e a fase da pesquisa. A comparação dos pesos iniciais mostra grupos de pesquisa homogêneos ( $p=0,33$ ) e está representada no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – EVOLUÇÃO DA MÉDIA DOS PESOS DOS ANIMAIS DURANTE A PESQUISA



NOTA: Cx = cirurgia; S = sacrifício; GCN = grupo controle nutrido; GNT = nutrido toxêmico; GDT = grupo desnutrido toxêmico; g=gramas.

Durante o período da desnutrição o GCN apresentou um ganho ponderal médio de 14,3%. O grupo GNT teve um ganho de peso de 26% enquanto que o grupo GDT apresentou uma perda ponderal de 21,9%. Ao final do período de desnutrição não havia diferença entre os grupos GCN e GNT, enquanto que a

diferença entre os dois grupos sem desnutrição e o grupo GDT foi significativa (TABELA 1).

TABELA 1 - MÉDIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS NO 21º DIA DO EXPERIMENTO

GRUPOS	n	PESOS NO 21º DIA			P
		MÉDIA	±	DP	
<b>GCN</b>	15	307,65	±	9,22	0,12
<b>GNT</b>	15	324,82	±	5,34	
<b>GCN</b>	15	307,65	±	9,22	0,0000
<b>GDT</b>	14	208,09	±	4,72	
<b>GNT</b>	15	324,82	±	5,34	0,0000
<b>GDT</b>	14	208,09	±	4,72	

NOTA: n - número de animais, DP – desvio-padrão, p - nível de significância estatística; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico; GDT = grupo desnutrido toxêmico

Durante o período de indução da toxemia pelo lipopolissacarídeo (LPS) até o momento da cirurgia, houve uma perda de mais 5% no peso do GDT e de 13,3% no GNT, porém, mantendo a diferença estatística significativa entre os dois grupos. O GCN submetido à aplicação apenas de soro fisiológico 0,9% (SF 0,9%), perdeu 6,4% do peso, mantendo-se semelhante ao GNT e diferente do GDT (TABELA 2).

TABELA 2 – MÉDIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA CIRURGIA

Grupos	n	PESOS NO DIA DA CIRURGIA			P
		Média	±	DP	
<b>GCN</b>	15	287,93	±	30,1	0,53
<b>GNT</b>	15	281,61	±	24,5	
<b>GCN</b>	15	287,93	±	30,1	0,000
<b>GDT</b>	12	197,53	±	20,2	
<b>GNT</b>	15	281,61	±	24,5	0,000
<b>GDT</b>	12	197,53	±	20,2	

NOTA: n - número de animais, DP – desvio-padrão, p - nível de significância estatística; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico; GDT = grupo desnutrido toxêmico

No período compreendido entre a cirurgia e o sacrifício dos animais a perda ponderal se manteve nos grupos submetidos à toxemia. No GDT foi de 11,1% e no GNT de 7,4%, mantendo a diferença estatística também no momento do óbito (TABELA 3).

TABELA 3 – MÉDIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DO SACRIFÍCIO

Grupos	n	PESOS NO DIA DO SACRIFÍCIO			p
		Média	±	DP	
<b>GCN</b>	15	285,95	±	22,4	0,007
<b>GNT</b>	13	260,69	±	23,2	
<b>GCN</b>	15	285,95	±	22,4	0,0000
<b>GDT</b>	9	175,52	±	13,9	
<b>GNT</b>	13	260,69	±	23,2	0,0000
<b>GDT</b>	9	175,52	±	13,9	

NOTA: n - número de animais, DP – desvio-padrão, p - nível de significância estatística; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico; GDT = grupo desnutrido toxêmico

## 4.2 ALBUMINA SÉRICA

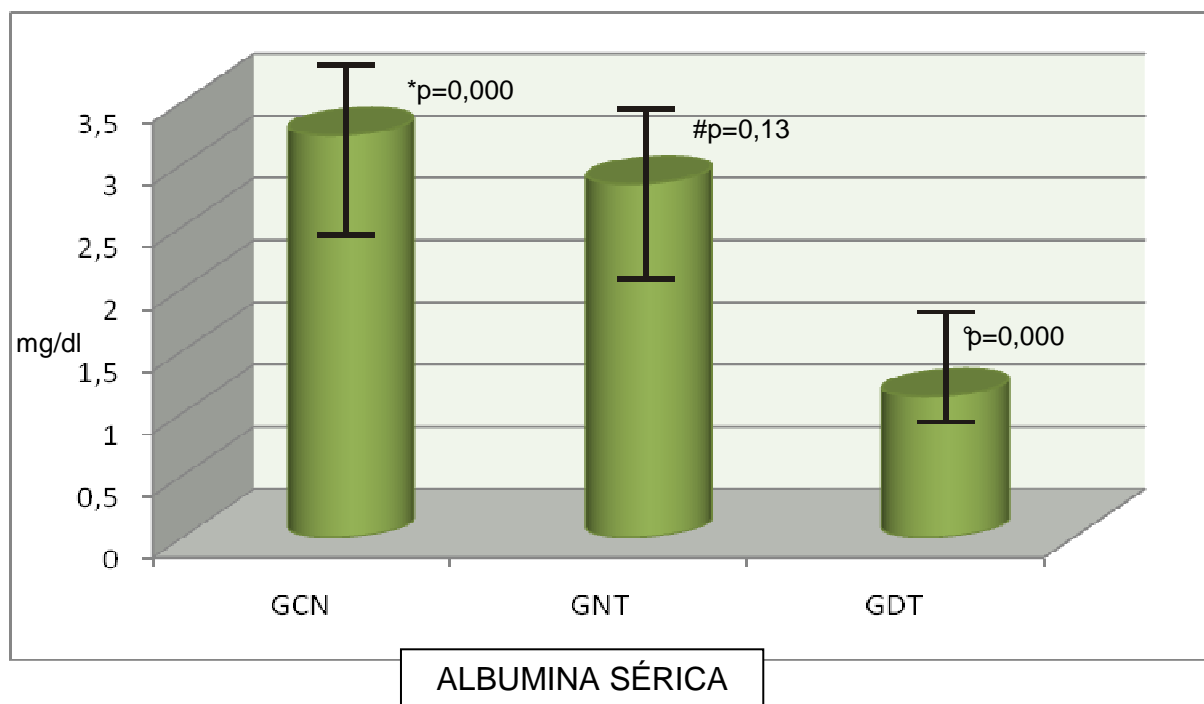
A albumina sérica foi mensurada no 26º dia do experimento, ao final da cirurgia, nos três grupos. Comparando os grupos dois a dois observou-se que os grupos GCN e GNT não demonstraram diferença significativa enquanto que na comparação dois a dois entre os GCN e GNT com o GDT foi significativa, (TABELA “4” E GRÁFICO 2).

TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DA ALBUMINA SÉRICA

Grupos	n	ALBUMINA SÉRICA			p
		Média	±	EP	
<b>GCN</b>	15	3,23	±	0,19	0,13
<b>GNT</b>	15	2,84	±	0,16	
<b>GCN</b>	15	3,23	±	0,19	0,0000
<b>GDT</b>	12	1,13	±	0,09	
<b>GNT</b>	15	2,84	±	0,16	0,0000
<b>GDT</b>	12	1,13	±	0,09	

NOTA: n - n° de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

GRÁFICO 2 – VALORES DA ALBUMINA SÉRICA NO VIGÉSIMO-SEXTO DIA DA PESQUISA



NOTA: p – nível de significância estatística; mg/dl – miligramas por decilitro; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico; #Nível de significância estatística entre GCN e GNT; \*Nível de significância estatística entre os grupos GCN e GDT; ° Nível de significância estatística entre os grupos GNT e GDT

### 4.3 TOXEMIA

Após iniciar a aplicação do LPS, os animais diminuíram a mobilidade, a ingesta alimentar e hídrica. Alguns apresentaram pilo ereção, hemorragia conjuntival e diarreia.

A avaliação laboratorial da toxemia foi feita através das dosagens de proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6) (TABELA 5).



TABELA 5 – AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA RESPOSTA À INDUÇÃO DA TOXEMIA PELO LPS

Grupos	n	PCR mg/dl	TNF- $\alpha$ pg/ml	IL-6 pg/ml
		Média $\pm$ EP	Média $\pm$ EP	Média $\pm$ EP
<b>GCN</b>	15	0,41 $\pm$ 0,11	6,73 $\pm$ 0,65	26,14 $\pm$ 3,01
<b>GNT</b>	15	2,42 $\pm$ 0,42	409,73 $\pm$ 56,51	123,73 $\pm$ 2,75
<b>GDT</b>	12	44,58 $\pm$ 4,20	757,67 $\pm$ 30,06	562,12 $\pm$ 71,17
<b>p GNT/GDT</b>		0,0000	0,0000	0,0001
<b>p GCN/GDT</b>		0,0001	0,0000	0,0000
<b>p GCN/GNT</b>		0,0001	0,0000	0,000

NOTA: n= nº de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística, PCR – proteína C reativa; TNF $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa; IL-6 – interleucina 6; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

#### 4.4 ESTUDO TENSIO MÉTRICO

Todos os corpos de prova no estudo apresentaram padrão de ruptura na linha de anastomose. As variáveis de força foram analisadas por comparação das médias.

A variável força máxima de tração (FMT) foi inferior no GDT quando comparada com GCN (p=0,0001) e GDT (0,006). Quando comparados os grupos não submetidos à desnutrição, os resultados foram semelhantes (p=0,13) (TABELA 6).

TABELA 6 – MÉDIAS DA VARIÁVEL FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Grupos	n	FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO	p
		Média $\pm$ EP	
<b>GCN</b>	15	0,18 $\pm$ 0,01	0,13
<b>GNT</b>	13	0,23 $\pm$ 0,03	
<b>GCN</b>	15	0,18 $\pm$ 0,01	0,0001
<b>GDT</b>	9	0,10 $\pm$ 0,01	
<b>GNT</b>	13	0,23 $\pm$ 0,03	0,006
<b>GDT</b>	9	0,10 $\pm$ 0,01	

NOTA: n - nº de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

#### 4.5 DENSITOMETRIA DO COLÁGENO

A avaliação do índice de maturação do colágeno foi determinada a partir das áreas ocupadas de colágeno tipo I (maduro) e tipo III (imaturo). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nas médias do colágeno maduro (TABELA 7).

TABELA 7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO COLÁGENO MADURO ENTRE OS GRUPOS

Grupos	n	COLÁGENO MADURO		p
		Média	± EP	
<b>GCN</b>	15	43,05	± 5,99	0,24
<b>GNT</b>	13	33,90	± 4,62	
<b>GCN</b>	15	43,05	± 5,99	0,71
<b>GDT</b>	9	40,32	± 4,31	
<b>GNT</b>	13	33,90	± 4,62	0,32
<b>GDT</b>	9	40,32	± 4,31	

NOTA: n - n° de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística, GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

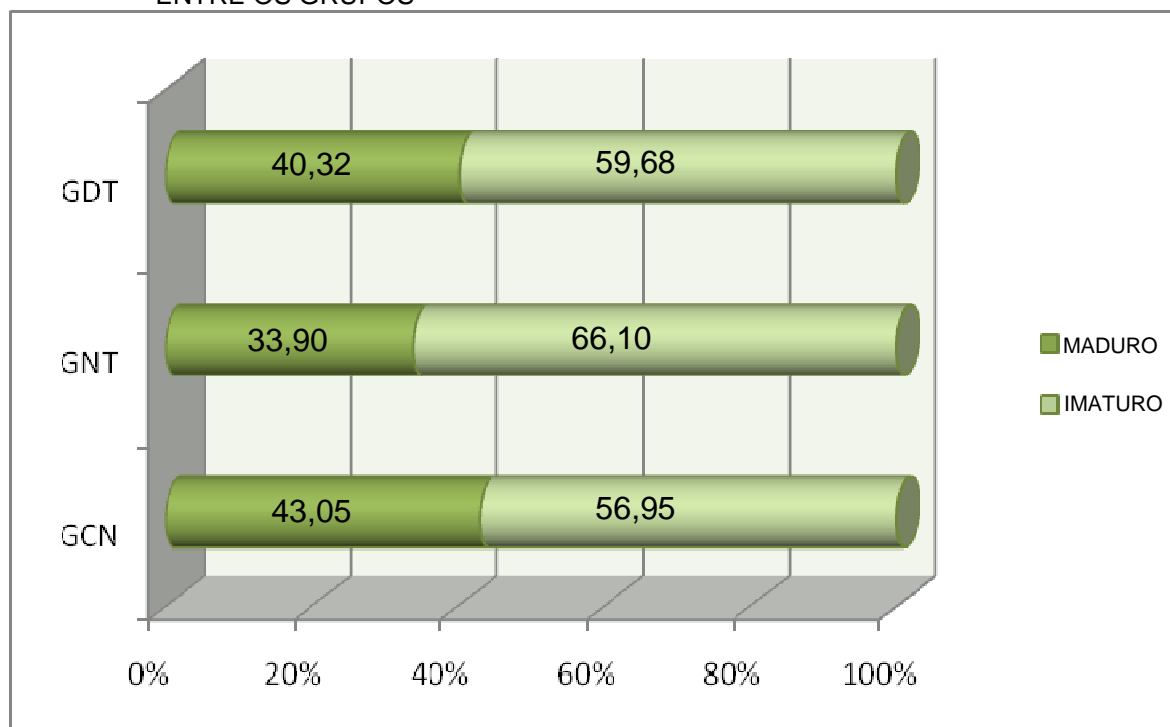
As médias do colágeno imaturo também não apresentaram diferenças entre os grupos (TABELA 8)

TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO COLÁGENO IMATURO ENTRE OS GRUPOS

Grupos	n	COLÁGENO IMATURO		p
		Média	± EP	
<b>GCN</b>	15	56,95	± 5,99	0,24
<b>GNT</b>	13	66,09	± 4,62	
<b>GCN</b>	15	56,95	± 5,99	0,72
<b>GDT</b>	9	59,67	± 4,31	
<b>GNT</b>	13	66,09	± 4,62	0,32
<b>GDT</b>	9	59,67	± 4,31	

NOTA: n - n° de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística, GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

GRÁFICO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO COLÁGENO MADURO E IMATURO ENTRE OS GRUPOS



NOTA: n - nº de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística, GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

A relação colágeno maduro/imaturo, ou seja, o índice de maturação do colágeno, apresentou valores semelhantes entre os grupos estudados (TABELA 9).

TABELA 9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO IMAc ENTRE GRUPOS GCN, GNT E GDT

Grupos	n	IMaC		p
		MÉDIA	± EP	
GCN	15	1,26	± 0,39	0,34
GNT	13	0,61	± 0,12	
GCN	15	1,26	± 0,39	0,93
GDT	9	0,75	± 0,12	
GNT	13	0,61	± 0,12	0,42
GDT	9	0,75	± 0,12	

NOTA: n - nº de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística, GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico, IMAc = índice de maturação do colágeno

#### 4.6 IMUNOISTOQUÍMICA

##### Número de Miofibroblastos

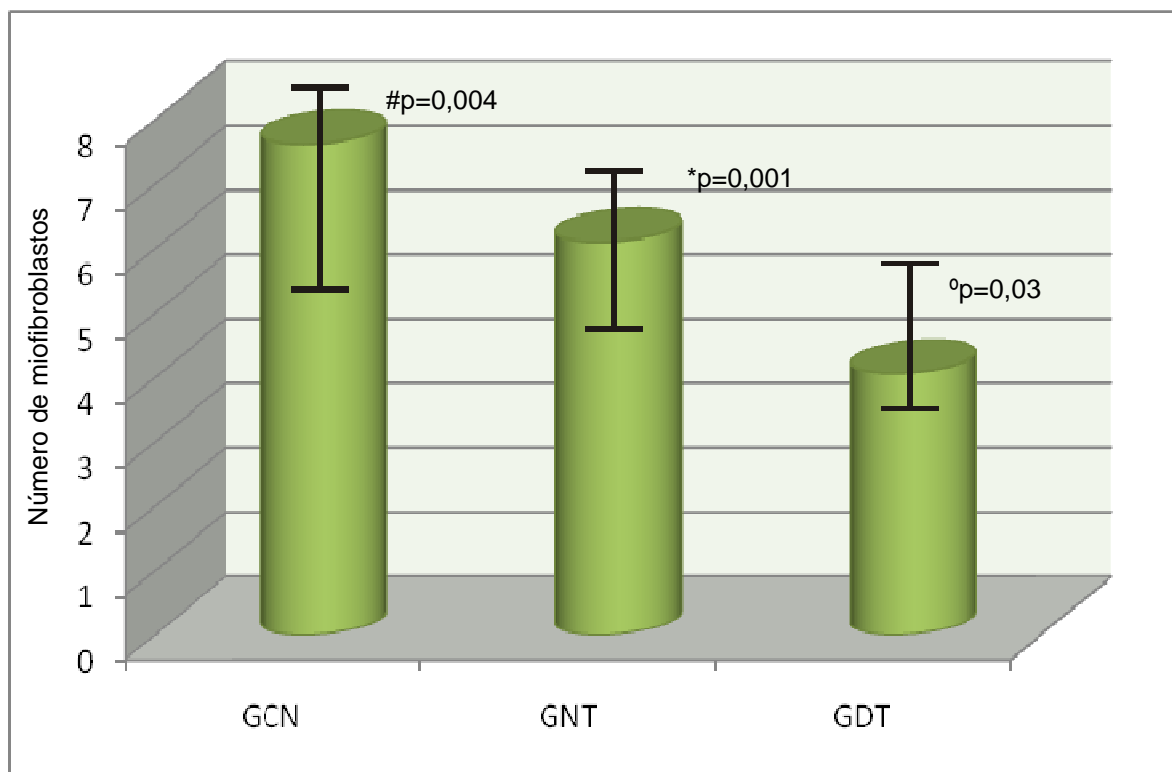
O número de miofibroblastos foi decrescente entre os grupos GCN, GNT e GDT, com diferenças estatísticas significantes entre os grupos, conforme demonstrado na TABELA 10 e ilustrado no GRÁFICO 4.

TABELA 10– VALORES MÉDIOS DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA POR IMUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTICORPO ANTI- $\alpha$ -ACTINA MUSCULAR

GRUPOS	n	NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS	p
		Média $\pm$ EP	
<b>GCN</b>	15	7,62 $\pm$ 0,28	0,004
<b>GNT</b>	13	6,10 $\pm$ 0,39	
<b>GCN</b>	15	7,62 $\pm$ 0,28	0,001
<b>GDT</b>	9	4,06 $\pm$ 0,77	
<b>GNT</b>	13	6,10 $\pm$ 0,39	0,03
<b>GDT</b>	9	4,06 $\pm$ 0,77	

NOTA: n - nº de animais, EP – erro-padrão, p – nível de significância estatística, GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico

GRÁFICO 4 – NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA



NOTA: p – nível de significância estatística; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico; #Nível de significância estatística entre GCN e GNT; \*Nível de significância estatística entre os grupos GCN e GDT; ° Nível de significância estatística entre os grupos GNT e GDT

### Número de vasos

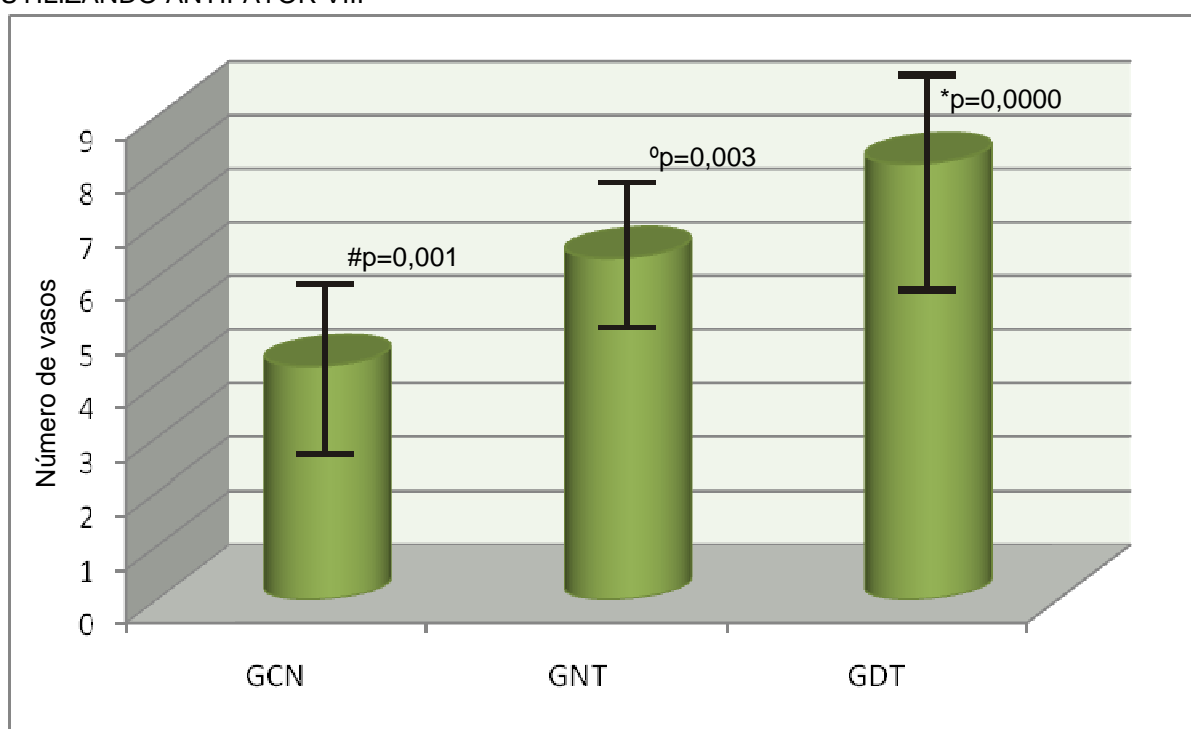
O número de vasos foi maior no GDT em comparação com os grupos GNT e GCN, com diferença estatística significativa. O GCN apresentou número de vasos menor que o GNT (TABELA 11 E GRÁFICO 5).

TABELA 11 – VALORES MÉDIOS DO NÚMERO DE VASOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA POR IMUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTIFATOR VIII

Grupos	n	NÚMERO DE VASOS		p
		Média	± EP	
<b>GCN</b>	15	4,33	± 0,39	0,001
<b>GNT</b>	13	6,35	± 0,40	
<b>GCN</b>	15	4,33	± 0,39	0,0000
<b>GDT</b>	9	8,11	± 0,35	
<b>GNT</b>	13	6,35	± 0,40	0,003
<b>GDT</b>	9	8,11	± 0,35	

NOTA: n - número de animais; EP – erro-padrão; p - nível de significância estatística; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico; GDT = grupo desnutrido toxêmico

GRÁFICO 5 – NÚMERO DE VASOS NA ANASTOMOSE COLÔNICA POR IMUNOISTOQUÍMICA UTILIZANDO ANTIFATOR VIII



NOTA: p – nível de significância estatística; GCN = grupo controle nutrido; GNT = grupo nutrido toxêmico, GDT = grupo desnutrido toxêmico; #Nível de significância estatística entre GCN e GNT;

\*Nível de significância estatística entre os grupos GCN e GDT; ° Nível de significância estatística entre os grupos GNT e GDT

O resumo dos resultados encontra-se no quadro abaixo:

QUADRO 3. COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS AVALIADAS NOS GRUPOS GNT E GDT COM O GCN

VARIÁVEIS	GNT	GDT
PESO NA CIRURGIA	≈	↓
ALBUMINA	≈	↓
PCR	↑	↑
TNF-α	↑	↑
IL-6	↑	↑
FMT	≈	↓
COLÁGENO I, III e IMaC	↓	≈
MIOFIBROBLASTOS	↓	↓
VASOS SANGUÍNEOS	↑	↑

NOTA: GNT= Grupo nutrido toxêmico

GDT= Grupo desnutrido toxêmico

PCR= Proteína C Reativa

FMT= Força Máxima de Tração

IMaC= Índice de Maturação do Colágeno

↑ = aumento

↓ = redução

≈ = semelhança

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliou-se a influência da desnutrição protéica e energética nas anastomoses do cólon de ratos submetidos à toxemia por lipopolissacarídeo (LPS).

O modelo da pesquisa foi desenvolvido para simular uma situação clínica freqüente na atividade do cirurgião. São pacientes com desnutrição protéica e energética que apresentam sepse requerendo tratamento cirúrgico com anastomose gastrointestinal. São pacientes submetidos a desafio séptico mantido, após sobreviver à fase aguda da sepse. Neste cenário, a avaliação da cicatrização da anastomose do cólon se torna um desafio e uma dúvida científica que devem ser pesquisados.

### 5.1 MÉTODO

#### 5.1.1 Animais

A avaliação da cicatrização da anastomose do cólon em humanos é bastante prejudicada por motivos técnicos e éticos. Assim, experimentos em animais são boas alternativas na investigação dos processos envolvidos na cicatrização normal bem como nas complicações.

A utilização de ratos se deve à facilidade e ao baixo custo de aquisição e de manutenção, é dócil, de fácil manuseio durante os experimentos e tem microflora fecal similar à do homem (WATTERS *et al.*, 1985). Há homogeneidade da amostra no sexo, idade e peso, além de linhagens bem definidas criadas em laboratório. Apresenta também boa resistência à infecção e a literatura é farta em modelos experimentais já estabelecidos como padrão ouro. Foram utilizados ratos machos, adultos jovens para evitar alterações hormonais que pudessem interferir no processo de cicatrização.

Existem limitações na utilização de animais como objeto de pesquisa na anastomose do cólon. Muitas conclusões não devem ser extrapoladas para humanos, devido às diferenças entre espécies. Koruda e Rolandelli (1990) mencionam que as diferenças vão além, e que mesmo entre populações humanas

há diferenças na morfologia do cólon relacionadas ao maior ou menor teor de fibras na dieta.

O pequeno tamanho do animal e, por conseguinte do cólon, são fatores citados que limitariam a realização da anastomose. Esta característica não criou dificuldade no momento das secções e anastomoses neste experimento. As anastomoses foram possíveis sem utilização de lentes de aumento e não se observaram sinais de obstrução intestinal ou fístulas no pós-operatório. O modelo já foi testado antes nesta linha de pesquisa mostrando-se consistente e reprodutível (COSTA et al., 2003; FERREIRA, 2004; GONÇALVES, 2005; SCHMITZ, 2006).

### 5.1.2 Desnutrição

Vários modelos de desnutrição são utilizados em pesquisas, alterando o tempo, quantidade e qualidade da dieta. Daly, Vars e Dudrick (1972) ofertavam dieta normocalórica e hipoprotéica de uma a quatro semanas. Irvin e Hunt (1974) utilizaram dieta isenta de proteína até sete semanas. Observaram que a esta dieta não era bem aceita pelos animais e determinou desnutrição calórica e protéica ao final. Ward *et al.* (1982) utilizou dieta hipoprotéica por sete dias.

Emery e Sanderson (1995) ofertaram 50% da ração que vinha sendo consumida pelos animais durante sete dias. Gruaz *et al.* (1993) reduziram a quantidade para sete e após, oito gramas por dia por 26 dias.

Em condições normais os animais consomem uma determinada quantidade de ração por dia. Contudo, quando fora de suas condições habituais (trauma, infecção, alteração ambiental, manipulação experimental) podem alterar a ingesta. Isso representa um problema quando se avalia uma amostra. Para evitar isso, utilizou-se a alimentação pareada (*pair feeding*) entre os grupos de estudo. Assim, se o grupo controle consumia maior ou menor quantidade, o grupo de estudo acompanhava esta oscilação.

A desnutrição protéica e energética é a forma mais comum de desnutrição na clínica. A desnutrição protéica pura é rara. Portanto, um modelo de desnutrição que acompanha o grupo controle, restringe calorias e proteína por um período de tempo de 21 dias foi considerado adequado. A perda de peso foi de 21,9% em 21 dias. Se for considerado que no período da indução da toxemia e no período pós-operatório



os ratos continuaram perdendo peso, chega-se ao momento do sacrifício com perda final de 34% em relação ao peso inicial. O estudo tensiométrico e as peças para estudo histológico foram obtidos neste momento.

### 5.1.3 Toxemia

A indução da sepse visou promover situação freqüente na atividade médica. São pacientes que após sobreviver à agressão inicial por uma infecção permanecem sob uma condição séptica, como um abscesso ou pneumonia. O modelo escolhido foi a endotoxemia por LPS, método dos mais utilizados para induzir um estado semelhante à sepse humana em experimentos animais.

As vantagens deste método incluem conveniência, precisão das dosagens e reprodutibilidade. A aplicação de uma única dose não consegue refletir o estímulo inflamatório persistente representado por um foco infeccioso verdadeiro. Para contornar este problema, as possibilidades existentes são infusão contínua ou aplicação de pequenas doses repetidas diariamente. Esta estratégia permite simular o estado hiperdinâmico da sepse e algum grau de disfunção pulmonar e/ou renal (FINK; HEARD, 1990).

A indução deste estado, semelhante à sepse por endotoxemia, apresenta diferenças em relação à sepse clínica. A resposta inflamatória induzida pela endotoxina pode ser deletéria e não apresenta o agente infectante (bactéria). Desta forma, a resposta de citocinas e anticorpos são diferentes. Como exemplo a resposta de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é muito maior após injeção de endotoxina do que após a sepse induzida por bactérias (BERCZI, 1998).

No presente estudo, o objetivo foi avaliar a influência da desnutrição e não a resposta à toxemia. Para isso a injeção de LPS cumpriu seu papel, visto que mesmo os animais do grupo nutrido que foram submetidos à toxemia apresentaram sinais clínicos de sepse, perderam peso durante este período e os exames laboratoriais confirmaram. Desta forma, no momento da cirurgia estavam sob influência da toxemia e, no grupo desnutrido toxêmico, também sob efeito da desnutrição.

#### 5.1.4 Técnica

A anastomose de cólon foi escolhida porque tem cicatrização mais lenta e apresenta mais complicações que outras anastomoses no sistema digestório, como íleo e estômago (BRASKEN; RENVALL; SANDBERG, 1991).

Utilizou-se fio monofilamentar de *nylon* 6-0, no presente estudo para obter mínima reação inflamatória tecidual pela presença do corpo estranho, pois esta poderia interferir no processo de cicatrização e ocasionar eventuais erros na análise dos resultados.

A anastomose colônica término-terminal com oito pontos de *nylon* 6-0, em pontos separados, faz parte da padronização de modelo utilizado em estudos antecedentes da mesma linha de pesquisa (COSTA *et al.* 2003; FERREIRA, 2004; GONÇALVES, 2005; SCHMITZ, 2006) com boa reprodutibilidade, permitindo a comparação com os estudos anteriores.

No presente estudo, foram realizadas duas anastomoses em cada animal em locais teoricamente heterogêneos (cólon proximal e cólon distal). Para eliminar esta variável, utilizou-se a alternância das peças anastomóticas para análise mecânica e histológica.

Utilizou-se o quinto dia pós-operatório para retirada das peças para estudo mecânico e histopatológico baseado no período de deposição do colágeno e ganho e força nas anastomoses. Segundo Oxlund *et al.* (1996) o maior aumento da quantidade de colágeno nas anastomoses do cólon ocorre entre o quarto e o sexto dia pós-operatório, coincidindo com o período de ganho de força tênsil. Gonçalves (2005), Kiyama *et al.* (2000) e Ekmektzoglu *et al.* (2006) fizeram as mesmas observações. Outro fator é que na prática cirúrgica diária, este é um dia crítico para o surgimento de fístula.

Jiborn, Ahonen e Zederfeldt (1980) concluíram que após sete dias de pós-operatório a força de ruptura na anastomose foi semelhante à força de ruptura do cólon intacto, portanto a avaliação mecânica deveria ser feita antes deste período. Law e Ellis (1989) estudaram os efeitos da desnutrição sobre a cicatrização colônica. Os autores demonstraram que ratos submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram índices de pressão de ruptura significativamente menores em relação ao grupo controle, principalmente entre o quarto e o sétimo dias pós-operatório. Os autores

sugerem que o quinto dia de pós-operatório é o período mais apropriado para investigar os efeitos da desnutrição protéica na cicatrização colônica em ratos.

## 5.2 VARIÁVEIS ESTUDADAS

### 5.2.1 Estudo tensiométrico

A avaliação mecânica das anastomoses é utilizada com frequência há mais de 40 anos em estudos de cicatrização de suturas intestinais. Os dois métodos de avaliação mais empregados são: pressão de ruptura e força de ruptura.

A pressão de ruptura é a medida da resistência da parede intestinal ao aumento da pressão intraluminal. A força de ruptura reflete a resistência da parede intestinal à força exercida na direção longitudinal.

Herrmann, Woodward e Pulaski em 1964 já utilizaram a força de tração para avaliar anastomoses. Daly, Vars e Dudrick (1972) adaptaram o equipamento utilizado por Cronin, Jackson e Dunphy (1968) para avaliação da pressão de ruptura. No Brasil, Naresse *et al.* (1987) desenvolveram aparelho para estudar a força de ruptura das anastomoses intestinais. Obtiveram um grau de precisão de 98% em estudo de anastomose de intestino delgado de cães.

O desenvolvimento tecnológico permitiu o acoplamento deste tipo de equipamento a computadores, permitindo registros mais precisos, como no equipamento universal de ensaio mecânico da marca EMIC utilizado nesta pesquisa ou como descrito por Ekmektzoglou *et al.* em 2006.

Não há consenso na literatura quanto à utilização de um ou outro método. Optou-se pelo estudo tensiométrico baseado em Ikeuchi *et al.* (1999) que compararam os dois métodos, concluindo ser este mais adequado em fases mais iniciais da cicatrização das anastomoses. Conclusões semelhantes foram obtidas por Jiborn, Ahonen e Zenderfeldt (1978) e por Brasken, Renvall e Sandberg (1991).

### 5.2.2 Avaliação da desnutrição

A presença de desnutrição pode ser determinada por parâmetros clínicos e laboratoriais. Utilizou-se como parâmetro clínico o peso e laboratorial a dosagem de albumina sérica.

As curvas de peso dos animais demonstram diferença de evolução nítida entre os grupos nutridos e desnutrido durante o período de desnutrição. Enquanto os animais do grupo de dieta normal aumentaram progressivamente o peso, o grupo desnutrido perdeu até atingir uma perda ponderal de 21,9% após 21 dias.

O comportamento diferente nas curvas de pesos quando submetidas à avaliação estatística mostra semelhança entre os grupos nutridos e diferença entre os nutridos em comparação com o desnutrido.

A avaliação do peso é um parâmetro útil para confirmar a desnutrição e também é uma referência para a avaliação da cicatrização da anastomose. Ward *et al.* (1982) utilizaram uma dieta com 25% de proteína por sete dias e após obtiveram perda de peso de 12,5% sem alteração de albumina, porém com pressão de ruptura inferior ao grupo controle. Avaliam que para perdas moderadas de peso, mesmo sem alteração de albumina, já pode indicar um grau de desnutrição que pode repercutir na cicatrização da anastomose do cólon. Justifica-se pela meia-vida da albumina de 20 dias.

Karahasanoglu *et al.* (1998) realizaram estudo experimental para avaliar o efeito da administração de hormônio de crescimento na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos submetidos à dieta hipoprotéica. Os autores observaram redução de 15% no peso dos ratos alimentados com dieta hipoprotéica até a cirurgia que continuou após o procedimento em torno de 5%. A pressão de ruptura foi menor nos ratos desnutridos em relação aos animais alimentados com dieta com concentração normal de proteínas. Curva de perda de peso semelhante foi obtida por Irvin (1978), atingindo após sete semanas perda de 37% e após oito semanas 44%. Esta perda apresentou repercussão na força tênsil da anastomose colônica.

No prosseguimento do experimento, tanto a indução da toxemia por LPS quanto a aplicação de soro fisiológico (SF 0,9%) alteraram a evolução dos pesos. No GCN submetido à aplicação de SF 0,9% a perda foi de 6,4%. A manipulação dos animais justifica esta perda e serve de parâmetro de controle para os grupos submetidos à toxemia.

O GNT perdeu 13,3% do peso e o GDT perdeu mais 5% do peso. Além da manipulação, como observado no GCN, a toxemia é capaz de induzir a perda de peso. Comportamento semelhante ao presente estudo foi observado em outras pesquisas.

Khalili *et al.* (2001) ao analisar anastomose de cólon após peritonite por ligadura e perfuração cecal (LPC) relataram que os ratos tiveram perda de peso superior a 10% em 48 horas, independente de realimentar imediatamente ou de manter o grupo de estudo apenas com água.

A aplicação de LPS em camundongos provocou perda aproximada de 10% do peso em sete dias, embora com perdas semelhantes no grupo controle que recebeu apenas SF 0,9% (ISHIMURA *et al.*, 2002).

Ahrendt, Tantry e Barbul (1996) em trabalho para pesquisar síntese de colágeno na anastomose de cólon em ratos, induziram sepse por LPC e os animais apresentaram perda de peso variando de 6% a 9,6% após 24 horas. Não houve diferença entre os grupos SHAM e LPC. Embora este resultado seja similar ao do presente estudo, cabe ressaltar que no caso houve além da sepse a manipulação cirúrgica dos animais, e o conseqüente predomínio do catabolismo após a agressão cirúrgica e infecção.

Na última etapa da pesquisa, do momento da cirurgia até o sacrifício, os três grupos perderam peso e chamou atenção a perda ocorrida no GNT. O efeito da toxemia se fez presente, a média de peso deste grupo reduziu muito e o peso médio deste grupo ficou menor que o GCN.

Pode-se concluir dos trabalhos acima que devemos ter cuidado ao analisar a perda de peso, visto que vários fatores podem influenciar. Controlou-se isto utilizando grupos com peso homogêneo no início da pesquisa, fazendo um GCN e submetendo à aplicação apenas do SF 0,9%. Demonstraram-se também as diferenças estatísticas entre grupos como forma de confirmar os efeitos de desnutrição e toxemia.

A albumina sérica dosada no dia da cirurgia, não demonstrou diferença entre os GCN e GNT, porém foi inferior no GDT.

Ainda que sujeita a críticas, a utilização da albumina sérica como parâmetro do estado nutricional é uma referência importante.

As desvantagens do uso são a meia vida longa de 21 dias, alteração por fatores como hidratação, stress, doença hepática, infecção, doença renal e estados

inflamatórios induzidos por citocinas. Sua utilidade é maior na identificação de desnutrição crônica (LANGEMO *et al.*, 2006).

### 5.2.3 Avaliação da toxemia

As evidências clínicas de toxemia encontradas no presente estudo foram a diminuição da mobilidade, diminuição da ingesta alimentar e de água presente em todos os animais, além de pilo ereção, diarreia e hemorragia conjuntival em menor intensidade. Estes parâmetros são apenas de observação e não fizeram parte de análises estatísticas.

Outra evidência foi a perda de peso ocorrida no GNT. Após uma curva ascendente, reverteu e nos 5 dias correspondentes à toxemia perdeu 13,3% do peso.

As evidências laboratoriais foram as dosagens de TNF- $\alpha$ , interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR). Todas demonstraram diferença entre o GCN e os dois grupos submetidos à toxemia. Este comportamento era esperado, visto que faz parte da resposta ao desafio pela endotoxina (LPS).

O LPS, constituinte da parede externa da membrana das bactérias Gram negativas é capaz de ativar o sistema imune e, através de citocinas, induzir desde resposta febril leve até o choque e óbito (BERCZI, 1998).

Em alguns mamíferos a resposta ao LPS desenvolve, após a ativação do sistema imune, uma profunda resposta neuroendócrina e metabólica. Nesta resposta de fase aguda estão envolvidos TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Uma das consequências é o aumento da PCR, estimulada pela IL-6.

A PCR é produzida no fígado e é um parâmetro de avaliação de doenças infecciosas e inflamatórias em geral. É uma molécula que reconhece patógenos e se liga ao LPS de algumas bactérias e fungos, ativa o complemento, induz quimiotaxia e aumenta a fagocitose por leucócitos e monócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

As dosagens de TNF-  $\alpha$  aumentam rapidamente após o estímulo pelo LPS. Eskandari *et al.* (1992) detectou pico da dosagem de TNF- $\alpha$  90 minutos após aplicação de LPS em camundongos. Este pico foi maior e mais precoce quando comparado à LPC. Não referiu dosagens tardias.

A resposta metabólica, endócrina e imune foi avaliada entre ratos nutridos e desnutridos, em condições basais e após indução de toxemia com LPS (GIOVAMBATTISTA *et al.*, 2000). Os autores observaram que o TNF- $\alpha$  era normal em níveis basais, mas aumentava muito após a indução de toxemia nos ratos desnutridos quando comparados com os nutridos. Este fato poderia explicar os níveis de TNF- $\alpha$  tão elevados e após 24 horas da última aplicação de LPS neste experimento, já que o comportamento habitual desta citocina seria um aumento apenas nas primeiras horas após indução da toxemia.

Níveis elevados de IL-6 são muito freqüentes durante a fase aguda da sepse e é a citocina que melhor se correlaciona com a mortalidade. Pode ser considerada até um marcador, mais que um mediador da sepse (HACK *et al.* 1989; CASEY; BALK; BONE, 1993).

#### 5.2.4 Estudo tensiométrico

Na avaliação mecânica das anastomoses colônicas utilizou-se o parâmetro força máxima de tração (FMT)

No presente estudo a FMT foi menor no GDT quando comparado com os GCN e GNT. Os dois grupos nutridos (GCN e GNT) não apresentaram diferença nesta variável. Os dados acima ressaltam o efeito negativo da desnutrição energética e protéica sobre a cicatrização da anastomose, neste parâmetro de avaliação da cicatrização de anastomose colônica em ratos. Na comparação dos grupos nutridos, a presença de toxemia não influenciou na cicatrização.

O parâmetro FMT é o mais importante na avaliação mecânica das anastomoses, pois registra a força máxima suportada pelo tecido antes do início de sua ruptura (IKEUCHI *et al.*, 1999; LEMOS *et al.*, 2004)

A relação da extensão da desnutrição protéica na resistência tênsil da anastomose de cólon tem sido motivo de interesse e conflito.

Daly, Vars e Dudrick (1972) compararam ratos com dieta normal e isenta de proteínas por até seis semanas. Realizaram anastomose de cólon esquerdo e após sete dias encontraram redução na pressão de ruptura em animais desnutridos por apenas uma semana, ainda sem alteração na proteína. Após seis semanas de

desnutrição protéica e com perda de 26% do peso a pressão de ruptura reduziu 26%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ward *et al.* (1982) após desnutrição protéica por sete dias, anastomose de cólon e avaliação no sétimo dia pós-operatório, encontraram diminuição de 30% na pressão de ruptura.

A diminuição da tensão de ruptura em ratos submetidos à desnutrição protéica também foi demonstrada por Irvin e Hunt (1974). Os autores estudaram a cicatrização de anastomose colônica em ratos desnutridos e demonstraram diminuição significativa da tensão de ruptura da parede nas anastomoses colônicas do grupo desnutrido quando comparados ao grupo controle. Seus resultados, no entanto, só foram significativos quando os animais atingiram uma perda de 34% no peso e em sete semanas de desnutrição.

Karahasanoglu *et al.* (1998) avaliaram a pressão de ruptura no quarto dia pós-operatório em ratos submetidos a dieta hipoprotéica e encontraram diferença em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes também foram obtidos por Law e Ellis (1989). Após dieta hipoprotéica por duas semanas, anastomose colônica e estudo de pressão de ruptura no quinto dia pós-operatório, encontraram diminuição na pressão de ruptura quando comparado ao grupo controle.

No Brasil, Leite *et al.* (1993) promoveram desnutrição protéica por 21 dias e avaliou a força de tração em quatro momentos no pós-operatório (4,7,14 e 21 dias). Observaram diferença entre os grupos nutridos e desnutridos em todos os momentos. Apesar da diferença, houve aumento de força da anastomose ao longo do tempo mesmo no grupo desnutrido.

Gonçalves (2005) em pesquisa para avaliar o efeito da realimentação pré-operatória em ratos desnutridos, comparou a cicatrização da anastomose colônica em ratos nutridos e desnutridos. A FMT e a força de ruptura total foram maiores no grupo nutrido quando comparado ao grupo desnutrido.

Os mecanismos pelos quais a desnutrição afeta a cicatrização anastomótica não são totalmente compreendidos. Entre as possibilidades estão a ausência de aminoácidos para a síntese de colágeno e alteração na imunocompetência, favorecendo infecções (WARD *et al.*, 1982; WITTE; BARBUL, 2003). Também foi aventada a possibilidade que o edema local poderia favorecer a isquemia na linha de anastomose (Irvin e Hunt, 1974). A deficiência de vitaminas A e C, ou minerais



como zinco, ferro e cobre importantes na síntese e no *cross-link* do colágeno (THOMPSON; CHANG; JOBE, 2006).

Leite *et al.* (1993) sugeriram que a falha na cicatrização seria decorrente do depósito inadequado de colágeno, com prováveis alterações das ligações intra e intermoleculares. Schaffer *et al.* (1997), estudando cicatrização cutânea em ratos desnutridos encontraram redução do acúmulo de colágeno na cicatriz, atribuído à redução do óxido nítrico no local.

O achado do presente estudo e a análise da literatura demonstram que a desnutrição está associada à piora na cicatrização da anastomose do cólon, quando se utiliza parâmetros de avaliação mecânica.

#### 5.2.5 Avaliação histológica

A avaliação histológica pelo *picrosirius red* com microscopia polarizada não demonstrou diferença nos valores de colágeno maduro (tipo I) e colágeno imaturo (tipo III) entre os grupos de estudo. A relação colágeno maduro/colágeno imaturo (IMaC) foi semelhante entre os grupos também. Neste método de avaliação não foi mensurada a quantidade total de colágeno, mas a proporção entre colágeno maduro e imaturo.

A expressão gênica de colágeno tipo I e tipo III foi estudada por Ahrendt, Tantry e Barbul (1996) na presença de sepse abdominal por LPC. Observaram um aumento do colágeno tipo I no primeiro dia de pós-operatório que não se mantinha no quarto dia. Enquanto o grupo controle apresentava uma diminuição no primeiro e um aumento importante no quarto dia. Da mesma forma, o colágeno tipo III não aumentou no primeiro dia de pós-operatório, como seria de esperar, visto que o colágeno imaturo é sintetizado mais precocemente. Sugerem que na presença de infecção intra-abdominal ocorra um distúrbio na regulação da sequência temporal de síntese de colágeno.

No mesmo artigo os autores citam trabalho do grupo de pesquisa, não publicado, em que a aplicação do LPS intraperitoneal também resultou em uma alteração similar na expressão do gene do colágeno na cicatrização da anastomose colônica. Esta é a única citação da influência do LPS na cicatrização anastomótica

A avaliação qualitativa do colágeno corado com *picrosirius* foi estudada por Gonçalves (2005) na comparação entre ratos nutridos, desnutridos e com ratos

desnutridos e realimentados no pré-operatório. A autora observou diminuição do colágeno tipo I no grupo desnutrido e no grupo desnutrido e realimentado no pré-operatório. Neste, com concentração de colágeno tipo I maior que o grupo desnutrido. Concluiu que a desnutrição ocasionou menor organização e espessamento das fibras de colágeno e menor proporção de colágeno maduro. Estes efeitos foram parcialmente revertidos pela realimentação pré-operatória.

Brasken, Renvall e Sandberg (1991) demonstraram que após a lesão do cólon, a expressão gênica basal de colágeno, medida por *Northern Blotting*, é acentuadamente ativada, atingindo pico no terceiro dia para o colágeno tipo I e por volta do segundo dia para o colágeno tipo III. Na avaliação imunoistoquímica o pico de concentração do colágeno tipo I ocorreu no sétimo dia pós-operatório. A síntese de colágeno tipo III avaliado por imunoistoquímica é mais precoce e reduz muito ao final de sete dias. Esta evolução poderia explicar a relação de colágeno tipo I menor que o tipo III no presente estudo, visto que foi avaliado no quinto dia pós-operatório

Rabau *et al.* em 1995, utilizaram análise quantitativa e qualitativa (*picrosirius*) para avaliar a cicatrização de anastomoses intestinais em ratos, comparando grupos controle (sem anastomose) e grupo experimental (anastomose intestinal), sacrificados no quarto, sétimo, décimo e 21º dias de pós-operatório. Os autores verificaram que a análise quantitativa (concentração total de colágeno) não demonstrou alterações significativas nos grupos submetidos à anastomose intestinal. Por outro lado, a análise do colágeno com *picrosirius* demonstrou maior índice de colágeno tipo III entre o quarto e o sétimo dias de pós-operatório, e a partir do décimo ao 21º dia houve progressivo aumento de fibras colágenas do tipo I. O presente estudo apresentou resultados semelhantes entre os grupos GCN, GNT e GDT. Avaliações em períodos mais tardios de pós-operatório poderiam mostrar alteração na proporção de colágeno maduro para imaturo.

Kiyama *et al.* (2000) estudaram a influência da nutrição pós-operatória precoce na cicatrização de anastomoses colônicas, na presença de sepse intra-abdominal por LPC em ratos. A avaliação foi feita no quinto dia pós-operatório. A percentagem de colágeno total nas anastomoses foi 17,2% maior no grupo que recebeu nutrição precoce que no grupo que recebeu nutrição tardiamente no pós-operatório. A diferença foi devido ao maior conteúdo de colágeno maduro no grupo de nutrição precoce. Porém, quando compara com ratos não submetidos à sepse, observa uma diminuição de 50% no colágeno maduro.

Costa *et al.* (2003), utilizando a mesma metodologia, encontraram maior proporção de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I no terceiro e oitavo dia pós-operatório no grupo de ratos suplementados com glicina, enquanto que no grupo suplementado com glutamina houve maior proporção de colágeno tipo I, maduro. Esta relação foi diferente do encontrado no GCN do presente estudo e se assemelhou aos grupos GNT e GDT.

Schmitz (2006) em estudo que avaliou a suplementação perioperatória com glutamina observou maior proporção de colágeno imaturo em relação ao colágeno maduro no quarto dia pós-operatório em todos os grupos do experimento. O comportamento da deposição de colágeno foi semelhante ao encontrado no presente estudo.

## 5.2.6 Avaliação Imunoistoquímica

### 5.2.6.1 Miofibroblastos

A avaliação do número de miofibroblastos pela imunoistoquímica mostrou valores diferentes entre os grupos, de forma decrescente entre o GCN, GNT e GDT. A interpretação para este achado é que a toxemia reduziu o número de miofibroblastos, pois na comparação do GCN e do GNT a diferença foi significativa. A comparação entre os GNT e o GDT demonstrou diminuição no número de miofibroblastos neste grupo, porém a diminuição não se refletiu na deposição de colágeno maduro que foi semelhante entre os grupos.

Law e Ellis (1990) encontraram diminuição do número de fibroblastos na anastomose colônica de ratos submetidos à desnutrição protéica. Este efeito foi revertido pela nutrição parenteral. A pressão de ruptura da anastomose também foi menor no grupo desnutrido. Em sua análise, o aumento de fibroblastos precede a síntese de colágeno que ao final determina a resistência da anastomose.

A revisão atualizada da literatura não mostra pesquisas da presença de miofibroblastos na cicatrização, na presença de desnutrição e sepse. Pode-se inferir que alterações desencadeadas pela resposta inflamatória ou pela desnutrição podem alterar a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, visto que é dependente de citocinas, em particular o TGF- $\beta$ . No entanto um achado que deverá

ser melhor estudado é que a despeito da diminuição dos miofibroblastos, a deposição de colágeno não foi alterada na comparação entre os grupos estudados.

#### 5.2.6.2 Número de vasos

O número de vasos apresentou comportamento crescente entre os GCN, GNT e GDT pela avaliação imunoistoquímica.

Embora não se encontre na literatura avaliação por método semelhante e com o mesmo modelo do presente estudo, as evidências sugerem que o resultado deveria ser o oposto, isto é, um maior número de vasos nas anastomoses dos grupos nutridos e em especial, no grupo nutrido e não submetido à toxemia pelo LPS. A razão é que uma melhor cicatrização implica também em uma melhor angiogênese. Pode-se inferir que embora tenha havido aumento do número de vasos, não tenha havido uma melhor perfusão tecidual.

Seifert *et al.* (1997), demonstraram um aumento significativo do número de vasos na anastomose colônica de ratos quando comparou o terceiro com o sétimo dia pós-operatório. Este aumento ocorreu no centro da anastomose e em áreas mais periféricas.

Attard *et al.* (2003), avaliaram anastomoses de cólon de ratos submetidos a hipóxia. Encontraram um aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular no grupo submetido à hipóxia, associado à menor pressão de ruptura da anastomose. Sugerem que a despeito de aumento do fator de crescimento, o tecido foi incapaz de responder ao estímulo. Não foi feita avaliação histológica tecidual, porém, pode-se inferir que tenha havido um aumento de vasos semelhante ao observado no presente estudo, sem alteração na resistência da anastomose.

Te Velde *et al.* (2002), avaliaram o efeito do angiostatin, um inibidor da angiogênese, na anastomose colônica de camundongos no sétimo dia pós-operatório. Houve menor pressão de ruptura acompanhada de redução do número de vasos neoformados pela imunoistoquímica, utilizando como marcador anti fator VIII, semelhante ao presente estudo.

Te Velde *et al.* (2003) novamente utilizando angiostatin, encontraram diminuição do número de vasos no tecido de granulação, acompanhado de menor

deposição de colágeno. Os resultados dos dois estudos reforçam a hipótese de que uma adequada cicatrização requer uma adequada angiogênese.

Outro mecanismo que pode justificar a angiogênese aumentada nos grupos submetidos à toxemia e, principalmente no GDT, é a presença de isoformas diferentes do fator de crescimento endotelial vascular. Dvorak (2005), em artigo de revisão sobre angiogênese relata que vários fatores influem na síntese de diferentes formas deste fator de crescimento com diferentes padrões morfológicos de neovascularização.

Frantz *et al.* (2005) referem que o LPS diretamente pode estimular angiogênese através do TLR4, mesmo na ausência de ação de citocinas. O aumento do número de vasos poderia ser explicado por este mecanismo. Além deste mecanismo, o aumento de citocinas, em particular o TNF- $\alpha$ , bem como o aumento de macrófagos, podem induzir a uma maior vascularização na cicatrização.

Mais estudos deverão ser realizados, na tentativa de buscar explicações para o aumento do número de vasos na cicatrização da anastomose sem a respectiva melhora na deposição de colágeno.

### 5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

A compreensão total da cicatrização das anastomoses está distante de ser alcançada.

A avaliação mecânica da anastomose tem se mostrado consistente na linha de pesquisa e deverá continuar sendo utilizada como método de referência de avaliação da cicatrização das anastomoses gastrointestinais.

Ao achado do aumento do número de vasos sanguíneos, sem uma equivalente melhora na relação colágeno maduro e imaturo neste estudo, cabe buscar explicações, pois intervenções nesta fase importante da cicatrização poderão trazer perspectivas mais favoráveis. Talvez o controle dos mecanismos envolvidos na resposta proinflamatória e antinflamatória seja o caminho.

Mais estudos deverão ser feitos para compreensão dos mecanismos pelos quais a desnutrição piora a cicatrização das anastomoses. Estudar os mecanismos que regulam a síntese e degradação do colágeno, em especial a ação das metaloproteinases, responsáveis por este processo.

Estudos experimentais com intervenções terapêuticas de reposição nutricional com fórmulas completas ou com nutrientes específicos, como por exemplo, a imunonutrição poderá advir do modelo do presente estudo.

Enquanto novos conhecimentos não chegam, aos profissionais da saúde cabe um cuidado máximo na avaliação nutricional pré-operatória e, sempre que possível, tratar déficits específicos de nutrientes antes da cirurgia.

Os objetivos das intervenções nutricionais pós-operatórias devem visar melhor cicatrização, redução dos riscos de infecção e manter o paciente com uma nutrição completa. Deve prover adequada quantidade de calorias, proteínas, vitaminas e oligoelementos, de acordo com o estado nutricional prévio e o consumo metabólico exigido no pós-operatório. Monitorar a ingesta adequada e a tolerância do paciente à alimentação ofertada.

Aos cirurgiões caberá utilizar técnica adequada, mínimo traumatismo tecidual, prevenir contaminação e preservar a viabilidade do tecido.

## 6 CONCLUSÃO

A desnutrição protéica e energética em ratos submetidos à toxemia pelo Lipopolissacarídeo (LPS) provocou piora na cicatrização da anastomose colônica de ratos, no quinto dia pós-operatório.

- 1- Há redução da resistência mecânica avaliada pelo estudo tensiométrico..
- 2- Não há diferença na relação colágeno maduro e imaturo entre os grupos.
- 3- Há redução da proliferação de miofibroblastos e aumento de vasos sanguíneos nas anastomoses dos animais desnutridos submetidos à toxemia pelo LPS.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citokines. In: \_\_\_\_ **Cellular and molecular immunology**. 6<sup>TH</sup> ed. Philadelphia, Elsevier, 2007, p. 267-301.
- ABREU, M. T.; ARDITI, M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. **J Pediatr**, v. 144, n. 4, p. 421-9, 2004.
- AHRENDT, G. M.; GARDNER, K.; BARBUL, A. Loss of colonic structural collagen impairs healing during intra-abdominal sepsis. **Arch Surg**, v. 129, n. 11, p. 1179-83, 1994.
- AHRENDT, G. M.; TANTRY, U.; BARBUL, A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. **Am J Surg**, v. 171, n. 1, p. 102-08, 1996.
- AIRD, W. C. Vascular bed-specific hemostasis? Role of endothelium in sepsis pathogenesis. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 528-34, 2001.
- AMARAL, A. OPAL, S. M.; VINCENT, J. L. Coagulation in sepsis, **Intensive Care Med**, v. 30, n. 6, p. 1032-40, 2004
- ANGUS, D. K.; LINDE-ZWIRBE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J. PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 1303-10, 2001.
- ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; CAVAILLON, J. Septic shock. **Lancet**, v. 365 p. 63-8, 2005.
- ATTARD, J. P.; RAVAL, M. J.; MARTIN, G. R.; KOLB, J.; AFROUZIAN, M.; BUIE, W. D.; SIGALET, D. L. The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. **Dis Colon Rectum**, v. 48, n. 7, p. 1460-70, 2003.
- AUSPRUNK, D. H.; FOLKMANN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvasc Res**, v. 14, n. 1, p. 53-65, 1977.
- BATTEGAY, E. J.; Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutics prospects. **J Mol Med**, v. 73, p. 333-346, 1995.
- BERCZI, I. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1, n. 840, p. 787-802, 1998.
- BEUTLER, B.; POLTORAK, A. Sepsis and evolution of the immune response. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 2-6, 2001
- BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 2, p. 169-76, 2003.



BLOMQUIST, P.; JIBORN, H. e ZEDERFELDT, B. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomoses. Breaking strength and collagen in the colonic wall following left colon resection and anastomosis in the rat. **Acta Chir Scand**, v. 150, n. 8, p. 671-5, 1984.

BONE, R.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-43, 1997.

BRASKEN, P.; LEHTO, M.; RENVALL, S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. **Acta Chir Scand**, v. 155, n. 8, p. 413-419, 1989.

BRASKEN, P.; RENVALL, S.; SANDBERG, M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses. **Br J Surg**, v.78, n. 9, p.1048-52, 1991.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CASEY, L.; BALK, R. A.; BONE, R. C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. **Ann Intern Med**, v. 119, n. 8, p. 771-778, 1993

CAVAILLON, J-M; ADRIE, C.; FITTING, C.; ADIB-CONQUY, M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance?. **J Endotoxin Res**, v. 9, n. 2, p. 107-107, 2003.

CHEN, J. X.; CHEN, Y.; DEBUSK, L.; LIN, W.; LIN, P. C. Dual functional roles of tie-2/angiopoetin in TNF-alfa-mediated angiogenesis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 1, p. 187-195, 2004.

CHRISTENSEN, H.; CHEMNITZ, J.; CHRISTENSEN, B. C. e OXLUND, H. Collagen structural organization of healing colonic anastomoses and the effect of growth hormone treatment. **Dis Colon Rectum**, v.38, n.11, p.1200-5, 1995.

CORRAL, C. J.; SIDDIQUI, A.; WU, L.; FARRELL, C. L.; LYONS, D.; MUSTOE, T. A. Vascular endothelia growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing, **Arch Surg**, v. 134, n. 2, p. 200-205, 1999.

CORREIA, M. I. e CAMPOS, A. C. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: the multicenter ELAN study. **Nutrition**, v.19, n.10, p.823-5, 2003.

COSTA, M. A.; CAMPOS, A. C.; COELHO, J. C.; DE BARROS, A. M. e MATSUMOTO, H. M. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 27, n. 3, p. 182-5, 2003.

CRONIN, K.; JACKSON, D. S. e DUNPHY, J. E. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. **Surg Gynecol Obstet**, v.126, n.4, p.747-53, 1968.

DALY, J. M.; VARS, H. M.; DUDRICK, S. J. Effects of protein depletion on strength of colonic anastomoses. **Surg Gynecol Obstet**. 134(1):15-21, 1972.

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 1998.

DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair Regen**, v. 13, n. 1, p. 7-12, 2005.

DICKS, S.; RICHEL, D.; PEPPELENBOSCH, M. LPS signal transduction; the picture is becoming more complex. **Curr Top Med Chem**, v. 4, n. 11, p. 1115-26, 2004

DVORAK, H. F. Angiogenesis: update 2005, **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1835-42, 2005

EKMEKTZOGLU, K. A.; ZOGRAFOS, G. C.; KOURKOULIS, S. K.; DONTAS, I. A.; GIANNOPOULOS, P. K.; MARINOU, K. A.; POULAKOU, M. V.; PERREA, D. N. Mechanical behavior of colonic anastomosis in experimental settings as a measure of wound repair and tissue integrity. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 35, p. 5568-5673, 2006.

ELLISON, G. W. Wound healing in the gastrointestinal tract. **Sem Vet Med Surg**, v. 4, n. 4, p. 287-93, 1989.

EMERY, P. W. e SANDERSON, P. Effect of dietary restriction on protein synthesis and wound healing after surgery in the rat. **Clin Sci (Lond)**, v.89, n.4, p.383-8, 1995.

ENESTVEDT, C.; THOMPSON, S. K.; CHANG, E. Y.; JOBE, B. A. Healing in gastrointestinal anastomoses, part II. **Microsurgery**, v. 26 n.3, p. 137-43, 2006.

ERGIN, E.; PAKSOY, M.; ERGUNEY, S.; USUN, H.; SAKOGLU, N. The effects of the immunomodulators on the colonic anastomosis in an experimental model of intraperitoneal sepsis. **Hepatogastroenterology**, v. 51, n. 56, p. 439-42, 2004.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes Infect**, v. 4, n. 8, p. 837-51, 2002.

ESKANDARI, M. K.; BOLGOS, G.; MILLER, C.; NGUYEN, D. T.; DE-FORGE, L. E.; REMICK, D. G. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. **J Immunol**, v. 148, n. 9, p. 2724-30, 1992.

FERREIRA, M. **Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno**. Curitiba, 2004. 139f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

FERREIRA M. M.; SCIALOM J. M.; CAMPOS A. D.; RAMALHO L. L. Z.; MARCHINI J. S.; FÉRES O.; ROCHA J. J. R. Efeito da Desnutrição na Cicatrização de

Anastomoses Colônicas: Estudo Experimental em Ratos. **Rev Bras Coloproct**, v. 26 n. 3, p. 239-243, 2006.

FINK, M. P.; HEARD, S. O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **J Surg Res**, v. 49, n. 2, p. 186-96, 1990.

FRANTZ, S.; VINCENT, K. A.; FERON, O.; KELLY, R. A. Innate immunity and angiogenesis. **Circ Res**, v. 7, n. 21, p. 15- 26, 2005.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. 5, p. 549-550, 1971.

GAILLARD, R. C.; SPINEDI, E.; CHAUTARD, T.; PRALONG, F. P. Cytokines, leptin, and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **N Y Acad Sci**, v. 917, p. 647-657, 2000.

GIOVAMBATTISTA, A.; CHISARI, A. N.; CORRO, L.; GAILLARD, R.C.; SPINEDI, E. Metabolic, neuroendocrine and immune functions in basal conditions and during the acute-phase response to endotoxic shock in undernourished rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, p. 92-98, 2000.

GLÜCK, T.; OPAL, S. M. Advances in sepsis therapy. **Drugs**, v. 64, n. 8, p. 837-59, 2004.

GOLUB, R.; GOLUB, R. W.; CANTU, R., JR. e STEIN, H. D. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. **J Am Coll Surg**, v.184, n.4, p.364-72, 1997.

GONÇALVES; C. **Cicatrização de anastomose colônica e nutrição pré-operatória em ratos desnutridos: estudo tensiométrico e de deposição do colágeno**. Curitiba, 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GOSAIN, A.; GAMELLI, R. L. A primer in cytokines. **J Burn Care Rehabil**, v. 26, n. 1, p. 7-12, 2005).

GRAY, F. J.; CALDWELL, F. H. Tensiometry in experimental surgery. A new apparatus for tensile strength studies in wound healing. **Br J Surg**, v. 54, n. 9, p. 761-3, 1967.

GRUAZ, N. M.; PIERROZ, D. D.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; SIZONENKO, P. C.; AUBERT, M. L. Evidence that neuropeptide Y could represent a neuroendocrine inhibitor of sexual maturation in unfavorable metabolic conditions in the rat. **Endocrinology**, v. 133, n. 4, p. 1891-4, 1993.

HACK, C. E.; DE GROOT, E. R.; FELT-BERSMA, R. J.; NUIJENS, J. H.; STRACK, R.J.; EERENBEG-BELMER, A. J.; TIJS, L. G.; AARDEN, L. A. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis, **Blood**, v. 74, n. 5, p. 1704-10, 1989

HENDRIKS, T.; VEREECKEN, T. H. L. B.; HESP, F.; SCHILLINGS, P. H.; DE BOER, H. H. Loss of collagen from experimental intestinal anastomoses: early events. **Exp Mol Pathol**, New York, v. 42, p. 411-418, 1985.

HENDRIKS, T. e MASTBOOM, W. J. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. **Dis Colon Rectum**, v.33, n.10, p.891-901, 1990.

HERRMANN, J. B.; WOODWARD, S. C. e PULASKI, E. J. Healing of colonic anastomoses in the rat. **Surg Gynecol Obstet**, v.119, p.269-75, 1964.

HESP, F. L.; HENDRIKS, T.; LUBBERS, E. J.; de BOER H. H. Wound healing in the intestinal wall. Effects of infection on experimental ileal and colonic anastomoses. **Dis Colon Rectum**, v. 27, n. 7, p. 462-7, 1984.

HESP, W. L. E. M.; HENDRICKS, T.; SCHILLINGS, P. H. M.; LUBBERS, E. J. C.; DE BOER, H. H. M. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. **Br. J. Exp. Path.**, Oxford, v. 66, p. 511-518, 1985.

de HING, I. H. J. T.; de MAN, B. M.; LOMME, R. M. L. M.; van GOOR, H.; HENDRIKS, T. Colonic anastomotic strength and matrix metalloproteinase activity in an experimental model of bacterial peritonitis. **Br J Surg**, v. 90, n. 8, p. 981-88, 2003.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.

HSU, S. M. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled anti-body (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, New York, v. 29, p. 577, 1981.

IKEUCHI, D.; ONODERA, H.; AUNG, T.; KAN, S.; KAWAMOTO, K.; IMAMURA, M. E MAETANI, S. Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. **Dig Surg**, v.16, n.6, p.478-85, 1999.

IRVIN, T. T. e HUNT, T. K. Effect of malnutrition on colonic healing. **Ann Surg**, v.180, n.5, p.765-72, 1974.

IRVIN, T. T. The effect of methionine on colonic wound healing in malnourished rats. **Br J Surg**, v.63, n.3, p.237-40, 1976.

IRVIN, T. T. Effects of malnutrition and hyperalimentation on wound healing. **Surg Gynecol Obstet**, v.146, n.1, p.33-7, 1978.

ISHIMURA, K.; MOROGUCHI, A.; OKANO, K.; MAEBA, T.; MAETA, H. Local expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 on wound healing of intestinal anastomosis during endotoxemia in mice. **J. Surg Res**, v. 108, n. 1, p. 91-7, 2002.

JIBORN, H.; AHONEN, J. ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic

anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. **Am J Surg**, v.136, n.5, p.587-94, 1978.

JIBORN, H.; AHONEN, J. e ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. **Am J Surg**, v.139, n.3, p.406-13, 1980.

JONSSON, K.; JIBORN, H. e ZEDERFELDT, B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. **Am J Surg**, v.145, n.6, p.800-3, 1983.

JONSSON, T. e HOGSTROM, H. Neutrophil-dependent decrease in early wound margin strength. **Arch Surg**, v.126, n.11, p.1423-6, 1991.

KARAHASANOGLU, T.; ALTINLI, E.; HAMZAOGLU, I.; PAKSOY, M.; YESILDERE, T.; ALEMDAROGLU, K. Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Br J Surg**, v.85, n.7, p.931-3, 1998.

KHALILI, T. M.; NAVARRO, R. A.; MIDDLETON, Y.; MARGULIES, D. R. Early postoperative enteral feeding increases anastomotic strength in a peritoneal model. **Am J Surg**, v. 182, n. 6, p. 621-4, 2001.

KIYAMA, T.; ONDA, M.; TOKUNAGA, A.; YOSHIYUKI, T.; BARBUL, A. Effect of early postoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in the presence of intra-abdominal sepsis in rats. **Dis Colon Rectum**, v. 43, n. 10, p. 54-58, 2000.

KONISHI, T.; WATANABE, T.; KISHIMOTO, J.; NAGAWA, H. Risk factors for anastomotic leakage after surgery for colorectal cancer: results of prospective surveillance. **J Am Coll of Surg**, v. 202, n. 3, p. 439-44, 2006.

KORUDA, M. J. e ROLANDELLI, R. H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. **J Surg Res**, v.48, n.5, p.504-15, 1990.

LAFLEUR, M. A.; HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. **Expert Rev Mol Med**, v. 5, n. 23, p. 1-39, 2003)

LANGEMO, D.; ANDERSON, J.; HANSON, D.; HUNTER, S.; THOMPSON, P.; POSTHAUER, M. E. Nutritional considerations in wound care. **Adv Skin Wound Care**, v. 19, n. 6, p. 206-211, 2006.

LAW, N. W. e ELLIS, H. Revised model for the study of colonic anastomotic healing in protein malnourished rats. **Eur J Surg Res**, v.21, n.3-4, p.218-23, 1989.

LAW, N. W. e ELLIS, H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Surgery**, v.107, n.4, p.449-54, 1990.

LEITE, C. V. S.; NARESSE, L. E.; KOBAYASI, S.; MINOSSI, J. G.; BURINI, R. C. CURI, P. R.; HOSSNE, W. S. Efeito da desnutrição protéica na anastomose do cólon

distal no rato. Estudo da força de ruptura e do colágeno tecidual. **Acta Cir Bras**, v. 8, n. 4, p. 145-50, 1993.

LEMONS, I. C. C.; CAMPOS, A. C.; DE ALMEIDA, M.; SCHULER, S. L.; GURMINI, J.; MALAFAIA, O. e ANDRADE, D. F. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **J Parenter Enteral Nutr**, v.28, n.4, p.241-4, 2004.

MÄKELÄ, J. T.; KIVINIEMI, H.; LAITENEN, S. Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis. **Dis Colon Rectum**, v. 46, n. 5, p. 653-60, 2003.

MARTENS, M. F. e HENDRIKS, T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. **Gut**, v.32, n.12, p.1482-7, 1991.

MARTENS, M. F.; HUYBEN, C. M. e HENDRIKS, T. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. **Gut**, v.33, n.12, p.1664-70, 1992.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v. 348, n. 16, p. 1546-54, 2003.

MAST, B. A. Healing in other tissues. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 77, p. 529-548, 1997.

NAGY, J. A.; BROWN, L. F.; SENGHER, D. R.; LANIR, N.; VAN DER WATER, L.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Pathogenesis of tumor stroma generation: acritical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. **Biochim Biophys Acta**, v. 948, n. 3, p. 305-326, 1989.

NARESSE, L. E.; MENDES, E. F.; CURI, P. R.; LUCCHIARI, P. H. e KOBAYASI, S. Aparelho para a medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v.42, p.204-208, 1987.

ORLANDO, M. D.; CHENDRASEKHAR, A.; BUNDZ, S.; BURT, E. T.; MOORMAN, D. W.; TIMBERLAKE, G. A. The effect of peritoneal contamination on wound strength of small bowel and colonic anastomoses. **Am Surg**, v. 65, n. 7, p. 673-5, 1999.

OXLUND, H.; CHRISTENSEN, H.; SEYER-HANSEN, M. e ANDREASSEN, T. T. Collagen deposition and mechanical strength of colon anastomoses and skin incisional wounds of rats. **J Surg Res**, v. 66, n. 1, p. 25-30, 1996.

PARKER, S. J.; WATKINS, P. E. Experimental models of Gram-negative sepsis. **Br J Surg**, v. 88, n. 1, p. 22-30, 2001.

POWELL, D. W.; MIFFLIN, R.C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Myofibroblast. I. Paracrine cells important in health and disease, **Am J Physiol Cell**, v. 277, n. 1, p. 1-9, 1999.

POWELL, D. W.; ADEGBOYEGA, P. A.; DI MARI, J. F.; MIFFLIN, R. C. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 289, n. 1, p. 2-7, 2005.

RABAU, M. Y.; HIRSBERG, A.; HISS, Y., DAYAN, D. Intestinal anastomosis healing in rat: collagen concentration and histochemical characterization by picosirius red staining and polarizing microscopy. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v.62, p.160-165, 1995.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002.

REINHART, K.; KARZAI, W. Antitumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 121-25, 2001.

RICE, T. W.; BERNARD, G. R. Therapeutic intervention and targets for sepsis. **Annu Rev Med**, v. 56, p. 225-48, 2005.

SAVAGE, F. J.; LACOMBE, L. P.; BOULOS, P. B.; HEMBRY, R. M. Role of metalloproteinases in healing of colonic anastomosis. **Dis Colon Rectum**, v. 40, n. 8, p. 962-970, 1997.

SCHAFFER, M. R.; TANTRY, U.; AHRENDT, G. M.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: A possible role of decrease wound nitric oxide synthesis. **J Am Coll Surg**, v. 184, n. 1, p. 37-43, 1997.

SCHMITZ, L. D. **Nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização da anastomose colônica de ratos desnutridos**. 89 f. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2006.

SEIFERT, W. F.; WOBBS, T.; HENDRIKS, T. Divergent patterns of matrix metalloproteinase activity during wound healing in ileum and colon of rats. **Gut**, v. 39, n. 1, p. 114-9, 1996.

SEIFERT, W. F.; VERHOFSTAD, A. A.; WOBBS, T.; LANGE, W.; RIJKEN, P. F.; VAN DER KOGEL, A. J.; HENDRIKS, T. Quantification of angiogenesis in healing anastomoses of the rat colon. **Exp Mol Pathol**, v. 64, n. 1, p. 31-40, 1997.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, 2004

TAKEMURA, T.; MAKINO, S.; TAKAO, T.; ASABA, K.; SUEMARU, S.; HASHIMOTO, K. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses to single vs. repeated endotoxin lipopolysaccharide administration in the rat. **Brain Research**, v. 767, p. 181-191, 1997.

TE VELDE, E. A.; VOEST, E.E.; VAN GORP, J. M.; VERHEEM, A.; HAGENDOORN, J.; GEBBINK, M. F.; RINKES, H. M. B. Adverse effects of the antiangiogenic agent

angiostatin on the healing of experimental colonic anastomoses. **Ann Surg Oncol**, v. 9, n. 3, p. 303-309, 2002.

TE VELDE, E. A.; KUSTERS, B.; MAASS, C.; WAAL, R.; RINKES, H. M. B. Histological analysis of defective colonic healing as a result of angiostatin treatment. **Exp Mol Pathol**, v. 75, n. 2, p. 119-123, 2003.

THOMPSON, S. K.; CHANG, E. Y.; JOBE, B. A. Clinical review: healing in gastrointestinal anastomoses, part I. **Microsurgery**, v. 26, n. 3. P. 131-136, 2006

THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surg Clin North Am**, v.77, n.3, p.546-73, 1997

TRUBIAN, P. S. **Influência do Octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. 86 p. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2004.

VAN DER POLL, T. Immunotherapy of sepsis. **Lancet infect Dis**, v. 1, n. 3, p. 165-174, 2001.

VINCENT, J. L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C. L.; RANIERI, V. M.; REINHART, K.; GERLACH, H.; MORENO, R.; CARLET, J.; LE GALL, J. R.; PAYEN, D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **Crit Care Med**, v. 34, n. 2, p. 344-53, 2006.

VIZZOTO JUNIOR, A. O. **Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos testado pela força de resistência à tração**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná.

WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T. e CORREIA, M. I. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v.17, n.7-8, p.573-80, 2001.

WARD, M. W.; DANZI, M.; LEWIN, M. R.; RENNIE, M. J. e CLARK, C. G. The effects of subclinical malnutrition and refeeding on the healing of experimental colonic anastomoses. **Br J Surg**, v.69, n.6, p.308-10, 1982.

WATTERS, D. A.; SMITH, A. N.; EASTWOOD, M. A.; ANDERSON, K. C.; ELTON, R. A. Mechanical properties of the rat colon: the effect of age, sex, and different conditions of storage. **Q J Exp Physiol**, v. 70, n. 1, p. 151-62, 1985.

WITTE, M.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, n. 77, v. 3, p. 509-528, 1997.

WITTE, M.; BARBUL, A. Repair of full-thickness bowel injury. **Crit Care Med**, v. 31, n. 8, pp. S538-S546, 2003.



## DOCUMENTOS CONSULTADOS

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 2: Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 3: Citações e notas de rodapé.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 4: Referências.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 9: Redação e editoração.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>>. Último acesso em: 18/05/2008.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/index.asp>>. Último acesso em: 05/11/2007.

## ANEXO I

INGESTA DIÁRIA DE RAÇÃO DO GRUPO CONTROLE E VALOR DO *PAIR FEEDING*

DIA	1		2		3		4	
	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO
Rato 1	50,91	19,78	51,8	16,24	50,16	16,01	50,46	23,93
Rato 2	51,05	23,23	50,47	26,36	51,46	31,72	50,38	27,91
Rato 3	50,34	20,46	51,13	21,07	50,16	27,7	50,87	31,81
Rato 4	50,02	21,6	51,55	13,92	50,54	12,65	50,08	11,82
Rato 5	50,66	19,52	50,29	30,06	50,5	26,52	50,86	27,64
Rato 6	51,63	36,42	50,12	29,2	50,73	30,94	50,3	28,87
Rato 7	50,25	26,95	50,41	27,78	50,33	30,68	50,05	29,59
Rato 8	50,07	23,17	50,52	46,08	50,44	45,59	51,08	39,58
Rato 9	51,05	23,23	50,62	29,71	50,12	29,59	50,14	28,85
Rato 10	50,42	27,06	51,37	25,46	50,01	24,18	50,76	25,76
Rato 11	50,37	21,77	50,9	22,09	50,77	25,29	50,19	20,5
Rato 12	50,64	20,48	50,49	17,87	50,48	26,81	50,73	24,55
Rato 13	51,36	19,11	50,36	22,43	50,16	29,32	50,12	21,41
Rato 14	51,52	18,6	50,05	27,5	50,16	26,79	50,88	23,52
Rato 15	50,76	19,26	50,18	21,69	50,91	32,66	50,34	24,78
MÉDIA	50,74	22,71	50,68	25,16	50,46	27,76	50,48	26,03
<i>Pair Feeding</i>		14,01		12,76		11,35		12,22

## LEGENDA:

RAÇÃO: quantidade de ração ofertada ao rato em gramas

MÉDIA: média da ingesta diária (ração ofertada – resto de ração)

RESTO: quantidade de ração que não foi ingerida pelo rato

*Pair Feeding*: Dieta ofertada ao controle-dieta ingerida pelo controle/2.

Óbito: óbito do rato submetido à desnutrição

5		6		7		8		9
RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO
50,1	13,69	50,38	21,71	51,02	29,72	50,44	24,56	50,46
50,21	25,16	50,11	26,09	50,43	27,9	50,65	28,79	50,74
50,6	41,24	50,05	47,45	50,08	39,08	50,02	40,8	50,03
50,31	8,82	50,08	20,17	50,18	18,08	50,62	15,51	50,87
50,35	26,3	50,82	25,81	51,13	29,19	50,04	26,87	50,71
50,89	28,23	50,85	42,42	50,41	32,76	51,25	33,06	50,04
50,72	26,69	50,29	25,74	50,01	28,41	51,41	26,18	50,59
50,25	50,25	50,79	48,48	50,05	44,14	50,27	43,29	50,02
51,07	25,68	50,59	26,96	50,21	18,78	50,32	31,41	51,25
50,53	25,67	50,09	26,71	50,03	27,12	50,84	27,84	50,65
50,36	20,53	50,68	27	50,53	20,19	50,34	17,7	51,06
50,63	19,39	50,8	28,92	50,62	29,26	50,39	22,12	50,78
50,69	20,84	50,8	20,86	50,77	23,61	50,31	22,91	50,63
50,79	19,34	50,42	26,7	50,72	25,73	50,04	23,67	50,44
50,9	25,9	50,43	24,29	50,9	28,65	51	29,61	50,76
<b>50,56</b>	<b>25,18</b>	<b>50,48</b>	<b>29,29</b>	<b>50,47</b>	<b>28,17</b>	<b>50,53</b>	<b>27,62</b>	<b>50,60</b>
	<b>12,69</b>		<b>10,60</b>		<b>11,15</b>		<b>11,45</b>	

	10		11		12		13	
RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO
22,04	50,94	23,11	50,31	20,33	50,9	21,14	50,46	25,16
28,33	50,17	26,34	50,43	25,4	50,4	24,69	50,44	19,71
41,07	50,73	39,98	50,89	30,1	50,35	41,25	50,36	31,78
3,37	55,75	5,67	50,97	8,62	50,79	5,4	61,31	19,75
24,77	50,11	23,12	50,67	30,26	50,04	22,72	50,67	25,13
28,47	50,32	27,89	50,56	19,62	50,26	22,64	50,02	25,98
28,33	50,04	26,78	50,2	25,1	50,21	21,11	50,09	26,42
46,36	50,94	48,76	50,45	44,12	50,73	44,43	50,05	47,32
26,69	50,51	29,64	50,42	32,77	50,39	17	50,02	18,96
27,5	50,49	26,87	50,12	28,14	50,22	22,66	50,04	28,09
20,44	51,4	19,6	50,03	15,55	50,6	20,24	50,33	17,63
20,72	51,01	27,83	50,58	28,47	50,73	18,97	50,1	21,01
20,41	50,73	22,45	50,48	15,3	51,03	17,2	50,99	22,4
23,71	50,65	30,7	50,94	23,03	50,75	22,21	50,01	25,15
24,27	50,6	28,9	50,06	20,32	50,07	21,47	50,36	26,4
<b>25,77</b>	<b>50,96</b>	<b>27,18</b>	<b>50,47</b>	<b>24,48</b>	<b>50,50</b>	<b>22,88</b>	<b>51,02</b>	<b>25,39</b>
<b>12,42</b>		<b>11,89</b>		<b>13,00</b>		<b>13,81</b>		<b>12,81</b>
<b>14</b>		<b>15</b>		<b>16</b>		<b>17</b>		<b>18</b>

	19		20		21		22	
RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO
22,98	50,84	26,43	50,67	23,7	50,05	23,63	50,05	19,69
25,17	50,67	31,86	51,02	27,75	50,57	43,37	50,93	45,97
34,66	50,68	46,85	51,02	42,86	50,22	22,41	50,22	25,17
14,32	50,03	15,8	51,01	12,28	50,33	1,23	59,01	32,06
18,46	50,49	29,53	50,33	24,79	50,03	16,49	50,93	30,33
20,22	51,02	31,44	50,85	27,02	50,06	26,33	50,65	28,05
25,54	50,74	33	50,08	25,78	50,44	31,22	51,48	30,41
38,04	50,87	45,03	50,54	43,19	50,88	39,43	50,62	40,81
19,35	50,27	30,44	50,07	22,46	50,66	17,51	51,2	28,28
27,73	50,29	29,47	50,18	25,76	50,05	22,92	50,54	30,77
19	50,03	21,87	50,89	20,02	51,01	22,73	51,51	28,87
19,64	50,69	35,67	50	34,89	50,47	33,12	50,12	40,74
22,05	50,47	Óbito	50,72		50,74		50,01	
27,13	50,42	29,79	50,13	15,34	50,81	26,54	50,79	32,5
28,44	50,4	24,07	50,63	31,26	50,92	18,75	50,54	31,59
<b>24,18</b>	<b>50,53</b>	<b>30,80</b>	<b>50,54</b>	<b>26,94</b>	<b>50,48</b>	<b>24,69</b>	<b>51,24</b>	<b>31,80</b>
<b>13,67</b>		<b>9,86</b>		<b>11,80</b>		<b>12,90</b>		<b>9,72</b>

23		24		25		26	27	
RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	CIRUR	RAÇÃO	RESTO
51,88	40,94	50,05	29,55	50,88	11,86		50,74	32,84
51,4	46,75	51,28	46,01	50,35	8,15		51,6	40,06
50,84	23,03	50,83	20,15	51,77	21,31		50,69	37,83
52,84	30,33	50,17	20,4	50,99	25,88		51,32	32,62
50,45	24,58	50,23	27,38	50,24	25,47		51,43	37,08
50,33	31,91	50,55	26,62	51,05	16,23		50,79	42,62
50,03	27,33	50,29	30,76	50,62	30,39		50,13	Óbito
50,09	42,86	50,59	46,93	51,08	18,1		50,12	46,57
50,66	22,52	50,09	22,87	50,06	28,77		50,51	47,39
50,79	30,24	50,13	24,36	50,55	26		51,68	47,54
50,38	31,99	50,82	30,2	50,33	12,19		50,15	31,07
50,74	40,02	50,47	41,9	50,56	25,5		50,31	
51,58		50,16		51			50,3	
50,16	26,4	50,35	24,62	50,56	24,95		50,64	41,02
51,09	34,2	50,05	27,6	50,41	19,44		50,59	30,05
<b>50,88</b>	<b>32,36</b>	<b>50,40</b>	<b>29,95</b>	<b>50,70</b>	<b>21,02</b>		<b>50,73</b>	<b>38,89</b>
	<b>9,26</b>		<b>10,23</b>		<b>14,84</b>			<b>5,92</b>

28		29		30		31
RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	Sacrifício
50,31	29,02	50,62	27,18	50,38	24,1	
50,02	35,56	50,41	27,47	51,19	29,02	
50,54	25,17	50,71	25,33	50,12	25,81	
50,63	Óbito	50,91		51,22		
51,09	25,47	51,05	31,73	51,37	16,69	
50,32	37,01	50,93	Óbito RD	51,18		
50,66	48,98	50,39	38,53	51,3	37,22	
50,5	27,01	50,35	22,56	50,01	18,12	
50,44		50,57		50,33	34,35	
51,65	41,22	50,16	Óbito RD	51,6		
50,34	30,4	50,87	29,38	50,02	23,23	
50,7		51,56		51,42		
51,03	25,55	50,34	27,88	51,17	26,94	
51,7	38,11	51,28	29,59	51,59	28,41	
<b>50,71</b>	<b>33,05</b>	<b>50,73</b>	<b>28,85</b>	<b>50,92</b>	<b>26,39</b>	
	<b>8,83</b>		<b>10,94</b>		<b>12,27</b>	

## ANEXO II

## PESOS DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO

<b>GCN</b>	<b>D0</b>	<b>D7</b>	<b>D14</b>	<b>D21</b>	<b>Cx</b>	<b>Sacrifício</b>
1	274,37	285,44	315,53	320,4	295,4	309,6
2	275,58	296,59	325,38	294,2	265,5	273,94
3	267,37	225,83	235,09	202,51	221,7	233,58
4	283,04	302,63	340,73	350,01	330,1	324,52
5	243,57	265,54	285,78	304,8	286,7	293,08
6	260,45	251,59	277,78	284,01	272,8	266,86
7	269,89	288,36	316,71	332,3	311,4	273,67
8	285,32	327,04	328,59	345,49	331,77	313,61
9	274,37	286,6	323,36	337,6	316,4	285,97
10	258,05	269,94	291,83	303,35	282,4	265,42
11	268,79	293,38	324,01	323,2	300,8	289,31
12	284,17	291,98	320,76	283,8	240,2	304,64
13	274,54	290,4	317,49	318,64	293,7	288,11
14	254,79	264,49	291,67	297,5	284,6	285,22
15	260,73	283,98	310,26	316,92	285,5	281,73
<b>Media</b>	<b>269,002</b>	<b>281,586</b>	<b>306,998</b>	<b>307,6487</b>	<b>287,9313</b>	<b>285,9507</b>

<b>GNT</b>	<b>D 0</b>	<b>D 7</b>	<b>D 14</b>	<b>D 21</b>	<b>Cx</b>	<b>Sacrifício</b>
1	256	273,98	304,48	327,48	296,14	281,57
2	233,7	242,23	274,91	286,34	249,23	241,76
3	270,7	293,14	314,72	341,22	303,52	290,92
4	273,7	300,2	326,9	350,5	300,18	238,75
5	233,2	255,02	297	315,1	274,94	261,73
6	254,2	301,78	323,53	355,4	309,24	282,17
7	336,5	327,64	288,7	308,03	270,4	239,12
8	244,2	281	306,18	336,25	295,92	
9	237,4	238,7	269,4	294,32	259,65	231,44
10	264,4	293,9	312,19	344,56	304,6	290,26
11	239,2	264,5	283,5	323,15	286,75	260,41
12	266,8	275,23	295,52	327,44	291,04	274,64
13	267,2	293,46	316,7	338,7	262,89	
14	235	261	277,78	299,98	222,38	224,59
15	252,6	274,02	295,93	323,77	297,26	271,58
<b>Média</b>	<b>257,6533</b>	<b>278,3867</b>	<b>299,1627</b>	<b>324,816</b>	<b>281,6093</b>	<b>260,6877</b>

	<b>D0</b>	<b>D7</b>	<b>D14</b>	<b>D21</b>	<b>Cx</b>	<b>Sacrifício</b>
1	267,5	246,15	152,64			
2	240,17	238,55	201,52	182,34		
3	304,4	277,44	252,47	244,04	234,67	191,53
4	283,04	227,78	219,11	203,7		
5	248,12	219,89	218,45	210,5	175,35	175,92
6	282	250,25	235,23	216,16	209,4	182,99
7	275,02	237,5	224,28	204,53	198,7	171,23
8	247,04	221,76	220,72	204,37	181,2	
9	284,79	251,28	250,07	227,82	217	200,03
10	226,78	215,6	194,79	190,14	178,63	166,9
11	261,73	214,4	215,09	195,4	182,6	
12	304,35	268,25	244,72	235,97	222,63	154,83
13	261	227,49	214,72	199,19	193,4	165,65
14	274,33	236,27	212,67	207,03	203,82	170,59
15	234,32	204,68	209,72	192,13	173	
<b>Média</b>	<b>266,306</b>	<b>235,8193</b>	<b>217,7467</b>	<b>208,0943</b>	<b>197,5333</b>	<b>175,5189</b>

Legenda: GCN - grupo controle nutrido

GNT - grupo nutrido toxêmico

GDT – grupo desnutrido toxêmico

D0 – dia inicial

D7 – sétimo dia

D14 - 14º dia

D21 - 21º dia

Cx – Cirurgia

Peso em gramas

## ANEXO III

## QUADRO GERAL DE RESULTADOS

	Alb	PCR	TNF- $\alpha$	IL-6	Colágeno	Colágeno	IMaC
GNT	mg/dl	mg/dl	pg/ml	pg/ml	maduro	imaturo	
1	2,6	1,55	359	122,65	30,09	69,9	0,43
2	3,4	2,43	444	113,54	38,39	61,6	0,62
3	3,1	3,19	515	136,43	43,7	56,27	0,78
4	3,2	1,24	523	124,16	44,92	55,07	0,82
5	2,9	0,31	102	111,22	11,15	88,84	0,13
6	2,8	1,62	631	142,31	24,54	75,45	0,33
7	2,7	4,98	368	118,67	48,06	51,93	0,93
8	3,2	2,84	497	125,98			
9	4,4	3,52	884	133,8	35,31	64,68	0,55
10	2,1	1,66	241	122,26	32,57	67,42	0,48
11	3,3	1,31	120	114,53	16,56	83,43	0,20
12	2	0,24	313	141,12	51,44	48,55	1,06
13	2,6	2,14	356	113,11			
14	2,1	3,02	661	126,13	60,72	39,27	1,55
15	2,2	6,23	132	110,11	3,27	96,72	0,03
<b>Média</b>	<b>2,84</b>	<b>2,418667</b>	<b>409,733333</b>	<b>123,7347</b>	<b>33,90154</b>	<b>66,08692</b>	<b>0,606867</b>

Legenda: GNT– Grupo nutrido toxêmico; Alb – albumina; TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa; IL-6- interleucina seis; IMaC- índice de maturação do colágeno

	Alb	PCR	TNF- $\alpha$	IL-6	Colágeno	Colágeno	IMaC
GCN	mg/dl	mg/dl	pg/ml	pg/ml	maduro	imaturo	
1	3,8	0,83	12,1	32,5	61,8	38,19	1,62
2	3,3	0,12	8,5	21,2	81,48	18,51	4,40
3	3,4	0,36	5,7	34	52,53	47,46	1,11
4	3,5	0,58	6,9	56,1	36,52	63,47	0,58
5	2,9	0	4,2	23,6	83,49	16,5	5,06
6	3,3	0	3,8	12,9	27,79	72,2	0,38
7	3,1	0,62	2,3	35,4	64,05	35,94	1,78
8	4,6	0,17	5,7	17,3	29,39	70,69	0,42
9	3,8	0,85	6,3	14	12,46	87,53	0,14
10	3,3	0,96	7,4	21,5	13,04	86,95	0,15
11	2,6	0,45	8,1	19,6	16,06	83,93	0,19
12	4,4	0	5,3	12,7	41,5	58,49	0,71
13	2,1	1,26	3,6	36	23,95	76,04	0,31
14	2,2	0	9,4	31,8	53,77	46,22	1,16
15	2,2	0	5,3	23,5	47,88	52,11	0,92
<b>Média</b>	<b>3,233333</b>	<b>0,413333</b>	<b>6,306667</b>	<b>26,14</b>	<b>43,04733</b>	<b>56,94867</b>	<b>1,262368</b>

Legenda: GCN – Grupo controle nutrido; Alb – albumina; TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa; IL-6- interleucina seis; IMaC- índice de maturação do colágeno



	Alb	PCR	TNF- $\alpha$	IL-6	Colágeno maduro	Colágeno imaturo	IMaC
GDT	mg/dl	mg/dl	pg/ml	pg/ml			
1							
2							
3	1,03	46	716	218,66	25,99	74	0,35
4							
5	1,41	37	733	263,7	50,67	49,32	1,03
6	1,25	44	831	331,54	24,22	75,77	0,32
7	1,23	23	623	508,42	29,84	70,15	0,43
8	1,06	51	725	712,15			
9	1,33	72	902	626,39	55,54	44,45	1,25
10	1,27	66	775	759,03	53,99	46	1,17
11	1,14	31	682	441,24			
12	0,35	48	986	884,66	47,61	52,38	0,91
13	1,51	28	648	338,54	46,67	53,32	0,88
14	1,18	51	723	947,61	28,34	71,65	0,40
15	0,83	38	748	713,48			
<b>Média</b>	<b>1,1325</b>	<b>44,58333</b>	<b>757,6667</b>	<b>562,1183</b>	<b>40,32</b>	<b>59,67</b>	<b>0,75</b>

Legenda: GDT – Grupo desnutrido toxêmico; Alb – albumina; TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa; IL-6- interleucina seis; IMaC- índice de maturação do colágeno

GCN	NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS	NÚMERO DE VASOS	FMT
1	7	3,5	0,23
2	7,5	3,75	0,21
3	8,25	4,5	0,17
4	6,5	7,5	0,13
5	8,5	5	0,27
6	9,25	5,75	0,18
7	7,75	2,5	0,14
8	7,5	2,75	0,13
9	9,25	4,25	0,15
10	6,75	2	0,12
11	5,75	5	0,19
12	9,25	3	0,17
13	6,75	6,5	0,19
14	7,25	4,25	0,19
15	7	4,75	0,17
<b>Média</b>	<b>7,61666667</b>	<b>4,33333333</b>	<b>0,176</b>

Legenda: GCN- Grupo controle nutrido; FMT- força máxima de tração

<b>GNT</b>	<b>NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS</b>	<b>NÚMERO DE VASOS</b>	<b>FMT</b>
1	5,5	4,75	0,1100
2	7,25	6,5	0,1700
3	5,75	6,5	0,1900
4	5,25	8	0,2200
5	6	6,5	0,0900
6	4	4,5	0,1500
7	7,5	5	0,1800
8			
9	5,25	4,75	0,0760
10	8,5	7,25	0,1100
11	4,25	5	0,0230
12	7,25	8,5	0,1600
13			
14	5	7	0,2100
15	7,75	8,25	0,0920
<b>Média</b>	<b>6,096153846</b>	<b>6,346153846</b>	<b>0,1370</b>

Legenda: GNT- Grupo nutrido toxêmico; FMT- força máxima de tração

<b>GDT</b>	<b>NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS</b>	<b>NÚMERO DE VASOS</b>	<b>FMT</b>
1			
2			
3	5,5	7	0,11
4			
5	7,75	10	0,16
6	1,25	6,75	0,06
7	7,25	8,75	0,13
8			
9	2	8,5	0,09
10	2,5	8,25	0,09
11			
12	2,75	7	0,05
13	3,5	8,5	0,09
14	4	8,25	0,13
15			
<b>Média</b>	<b>4,055556</b>	<b>8,111111</b>	<b>0,101111</b>

Legenda: GDT- Grupo desnutrido toxêmico; FMT- força máxima de tração